

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Fyzikální chemie



Mgr. Olívia Petrvalská

Studium mechanismů regulace vybraných proteinkinas

Study of regulatory mechanisms of selected protein kinases

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.7.2018

Olívia Petrvalská

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za odborné vedení, jeho železnou trpělivost, otcovský přístup a cenné rady, které mi poskytl.

Také bych ráda poděkovala své konzultance RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za podporu a přátelský přístup.

Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře biofyzikální chemie proteinových komplexů na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy a Laboratoře strukturní biologie signálních proteinů Akademie věd České republiky za vytvoření příjemného pracovního prostředí, zejména Mgr. Daliborovi Koškovi Ph.D. za rady a pomoc v začátcích mého studia a jeho pomoc při měření a zpracování dat z analytické ultracentrifugace.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc. a prof. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc. z Fyzikálního ústavu MFF UK za měření a vyhodnocení dat z časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Taktéž děkuji RNDr. Petru Manovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR za hmotnostně-spektrometrická měření.

Na závěr děkuji své rodině za podporu v průběhu celého mého studia.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře Grantové agentury České republiky (Projekty č. 14-10061S a 16-02739S).

Abstrakt

Proteiny 14-3-3 skrze vazbu více než 300 vazebných partnerů regulují značné množství biologicky významných dějů, např. apoptosu, buněčný cyklus, přenos signálu či metabolické dráhy. V rámci této disertační práce byla studována úloha proteinů 14-3-3 v regulaci dvou vybraných proteinkinas ASK1 a CaMKK2. Hlavním cílem práce bylo pochopit strukturní podstatu mechanismů, kterými fosforylace a vazba proteinů 14-3-3 regulují aktivitu těchto proteinkinas pomocí různých biochemických a biofyzikálních metod, zejména metod bodové mutagenese, měření enzymové aktivity, analytické ultracentrifugace, maloúhlového rozptylu rentgenového záření, chemického zesílení, nukleární magnetické rezonance a fluorescenční spektroskopie.

Na základě získaných dat z maloúhlového rozptylu rentgenového záření a chemického zesílení byl navrhnout model struktury komplexu katalytické domény proteinkinasy ASK1 s proteinem 14-3-3ζ, který ukázal, že tento komplex je v roztoku konformačně heterogenní. Tento strukturní model společně s daty z časově rozlišené fluorescence a nukleární magnetické rezonance částečně vysvětlují inhibiční mechanismus proteinu 14-3-3. Získané výsledky ukázaly, že protein 14-3-3ζ interaguje s katalytickou doménou ASK1 v těsné blízkosti aktivního místa, a proto by tato interakce mohla mít vliv na strukturu nebo přístupnost této oblasti. Fyziologickým inhibitorem proteinkinasy ASK1 je i protein thioredoxin. Dalším výsledkem této disertační práce bylo zjištění, že tvorba cystinového můstku mezi Cys³² a Cys³⁵ v katalytickém centru thioredoxinu je hlavním faktorem, který je odpovědný za disociaci komplexu thioredoxinu 1 s thioredoxin-vazebnou doménou ASK1 při oxidaci.

Pro pochopení úlohy, kterou proteiny 14-3-3 hrají v regulaci proteinkinasy CaMKK2 byl na základě dat z maloúhlového rozptylu rentgenového záření navržen strukturní model komplexu proteinkinasy CaMKK2 s isoformou 14-3-3γ. Tento model naznačil, že v komplexu se katalytická doména CaMKK2 nachází mimo centrální kanál dimeru 14-3-3γ, přičemž 14-3-3γ přímo interaguje a ovlivňuje strukturu této domény CaMKK2, tedy mimo oblasti obsahující 14-3-3 vazebné motivy.

Výsledky této práce potvrzují, že proteiny 14-3-3 jsou důležitými alosterickými modulátory proteinkinas ASK1 a CaMKK2.

Abstract

Through binding interactions with more than 300 binding partners, 14-3-3 proteins regulate large amount of biologically relevant processes, such as apoptosis, cell cycle progression, signal transduction or metabolic pathways. The research discussed in this dissertation thesis was focussed on investigating the role of 14-3-3 proteins in the regulation of two selected protein kinases ASK1 and CaMKK2. The main goal was to elucidate the mechanisms by which phosphorylation and 14-3-3 binding regulate functions of these protein kinases using various biochemical and biophysical methods, such as site-directed mutagenesis, enzyme activity measurements, analytical ultracentrifugation, small-angle X-ray scattering, chemical crosslinking, nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopy.

A structural model of the complex between the catalytic domain of protein kinase ASK1 with 14-3-3 ζ , which was calculated using the small-angle X-ray scattering and chemical crosslinking data, suggested that this complex is conformationally heterogeneous in solution. This structural model together with data from time-resolved fluorescence and nuclear magnetic resonance suggested that the 14-3-3 ζ protein interacts with the catalytic domain of ASK1 in the close vicinity of its active site, thus indicating that the complex formation affects the structure and/or the accessibility of the active site. Another important result of this thesis was the finding that the oxidation-induced disruption of interaction between ASK1 and thioredoxin 1, which is also a physiological inhibitor of ASK1, is mainly due to the disulfide bond formation between residues Cys³² and Cys³⁵ in the catalytic site of thioredoxin.

To understand the role of 14-3-3 proteins in the regulation of protein kinase CaMKK2, a structural model of the complex between CaMKK2 and 14-3-3 γ was calculated based on small-angle X-ray scattering data. The model revealed that although the catalytic domain of CaMKK2 is located outside the central channel of the 14-3-3 γ dimer, the 14-3-3 γ protein directly interacts with this domain and affects its structure outside regions containing 14-3-3 binding motifs.

The results of this thesis confirmed that 14-3-3 proteins are important allosteric modulators of protein kinases ASK1 and CaMKK2.

Seznam použitých zkratk

14-3-3 Δ C	konstrukt 14-3-3 bez C-koncového flexibilního segmentu
AANAT	serotonin-N-acetyltransferasa
AID	autoinhibiční doména
AMPK	AMP-aktivovaná protein kinasa
aPK	z angl. atypical protein kinase
ASK1	z angl. apoptosis signal regulating kinase 1
ASK1-CRR	centrální regulační oblast molekuly ASK1
ASK1-KD	katalytická doména ASK1
ASK1-TBD	thioredoxin vazebná doména molekuly ASK1
AUC	analytická ultracentrifugace
C2	kaspasa-2
CaM	kalmodulin
CaMKID	z angl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D
CaMKK2	z angl. calcium/calmodulin dependent kinase kinase 2
CBD	kalmodulin vazební doména
CC	doména z angl. coiled-coil domain
CCC	C-koncová „coiled-coil“ doména
CRR	centrální regulační oblast
D_{\max}	maximální intramolekulární vzdálenost
DSF	diferenční skenovací fluorimetrie
DTT	1,4-dithiothreitol
ePK	z angl. eukaryotic protein kinase
ER	endoplasmatické retikulum
FOXO	z angl. forkhead-box transcription factor O
GS	experimentálně určení partneři proteinu 14-3-3 (z angl. golden standards)
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
KD	katalytická doména
K_d	zdánlivá disociační konstanta
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MKK4	mitogenem aktivovaná proteinkinasakinas 4
NCC	N-koncová „coiled-coil“ doména

NMR	nukleární magnetická rezonance
NSD	z angl. normalized spatial discrepancy
ot./min	otáčky za minutu
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
pASK1-KD	katalytická doména ASK1 fosforylována na Ser ⁹⁶⁶
pCaMKK2	fosforylována CaMKK2 na 14-3-3 vazebných motivech
PH	doména z angl. pleckstrin homology domain
PKA	cAMP-dependentní proteinkinasa
ppm	z angl. parts per milion
proC2	prokaspasa-2
proC2(dp)	proC2 fosforylována na dvou 14-3-3 vazebných motivech
R_g	gyrační poloměr
ROS	z angl. reactive oxygen species
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
Sup	Superdex
SV AUC	analytická ultracentrifugace, metoda sedimentační rychlosti
TBD	thioredoxin-vazebná doména
TCEP	z angl. tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEV	proteasa, z angl. Tobacco etch virus
TPR	z angl. tetratricopeptide repeat
TRAF	z angl. tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRX1	thioredoxin 1
v/v	objem/objem (z angl. volume/volume)
V_p	Porodův objem
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)
w/w	hmotnost/hmotnost (z angl. weight/weight)

Tato práce byla vypracována na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a na oddělení Strukturní biologie signálních proteinů Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. a je založena na následujících publikacích, jejichž kopie jsou uvedeny v příloze:

I. **Petrvalská, O.**, Kosek, D., Kukacka, Z., Tosner, Z., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T. (2016) Structural Insight into the 14-3-3 Protein-Dependent Inhibition of Protein Kinase ASK1. *J. Biol. Chem.* 291(39), 20753-65.

II. Kylarova, S.⁺, Kosek, D.⁺, **Petrvalská, O.**, Psenakova, K., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T. (2016) Cysteine Residues Mediate High-affinity Binding of Thioredoxin to ASK1. *FEBS J.* 283(20), 3821-3838.

III. Psenakova, K.⁺, **Petrvalská, O.**⁺, Kylarova, S.⁺, Santo, D. L., Kalabova, D., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T. (2018) 14-3-3 Protein Directly Interacts with the Kinase Domain of Calcium/calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase (CaMKK2). *Biochim. Biophys. Acta-General Subjects.* 1862(7), 1612-1625.

IV. Kalabova, D., Smidova, A., **Petrvalská, O.**, Alblova, M., Kosek, D., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V. (2017) Human Procaspace-2 Phosphorylation at both S139 and S164 is Required for 14-3-3 Binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493(2), 940-945.

⁺ rovnocenní první autoři

OBSAH

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam použitých zkratk	6
Obsah	9
1. Úvod.....	12
2. Literární přehled.....	14
2.1 Apoptosa	14
2.2 Proteinkinasy.....	14
2.2.1 MAPK signální kaskády	17
2.2.2 Ca^{2+} /kalmodulin signální kaskády.....	18
2.3 Proteiny 14-3-3.....	19
2.3.1 Biologický význam proteinů 14-3-3.....	19
2.3.2 Struktury proteinů 14-3-3 a jejich komplexů	20
2.3.3 Interakce proteinů 14-3-3.....	21
2.4 Proteinkinasa ASK1	23
2.4.1 Struktura proteinkinasy ASK1	24
2.4.2 Interakce ASK1 s proteinem 14-3-3	27
2.4.3 Interakce mezi ASK1 a thioredoxinem	27
2.4.4 Současný model regulace aktivity ASK1	29
2.5 Proteinkinasa CaMKK2.....	31
2.5.1 Struktura proteinkinasy CaMKK2.....	32
2.5.2 Regulace aktivity CaMKK	33
2.5.3 Interakce CaMKK s proteinem 14-3-3	34
2.6 Kaspasa-2.....	35
3. Cíle práce	38
4. Materiál a metody	40
4.1 Materiál a přístroje.....	40
4.1.1 Biologický materiál	40
4.1.2 Chemikálie.....	40
4.1.3 Ostatní materiál	42
4.1.4 Přístroje.....	42

4.2	Expresa a purifikace proteinů.....	44
4.2.1	Expresa a purifikace proteinu 14-3-3	44
4.2.2	Expresa a purifikace katalytické domény ASK1	44
4.2.3	Expresa a purifikace proteinu MKK4.....	46
4.2.4	Expresa a purifikace thioredoxin-vazebné domény ASK1	46
4.2.5	Expresa a purifikace proteinu thioredoxinu 1	47
4.2.6	Expresa a purifikace proteinu CaMKK2	47
4.2.7	Expresa a purifikace proteinu kalmodulinu	48
4.2.8	Expresa a purifikace proteinu AMPKA2.....	49
4.2.9	Expresa a purifikace proteinu CaMKID	49
4.2.10	Expresa a purifikace proteinu prokaspasy-2	49
4.3	Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti (SV AUC)	50
4.3.1	Sedimentační analýza komplexu ASK1-KD:14-3-3ζ.....	51
4.3.2	Sedimentační analýza komplexu ASK1-TBD:TRX1	51
4.3.3	Sedimentační analýza komplexu CaMKK2:14-3-3γ	52
4.3.4	Sedimentační analýza komplexu proC2:14-3-3ζ.....	52
4.4	³²P stanovení katalytické aktivity	53
4.4.1	Stanovení katalytické aktivity ASK1-KD	53
4.4.2	Stanovení katalytické aktivity CaMKK2.....	53
4.5	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)	54
4.5.1	SAXS analýza komplexu pASK1-KD:14-3-3ζΔC	54
4.5.2	SAXS analýza komplexu pCaMKK2:14-3-3γ.....	55
4.6	³¹P nukleární magnetická rezonance (³¹P NMR)	56
4.7	Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie.....	56
4.7.1	Časově rozlišené měření dohasínání intenzity fluorescence.....	57
4.7.2	Časově rozlišené měření dohasínání anizotropie fluorescence.....	57
4.8	Diferenční skenovací fluorimetrie (DSF)	58
5.	Výsledky a diskuse	59
5.1	Vliv vazby proteinu 14-3-3 na strukturu a funkci katalytické domény proteinkinasy ASK1 (publikace I)	59
5.1.1	ASK1-KD a protein 14-3-3ζ vytvářejí stabilní komplex se stechiometrií 2:259	
5.1.2	Vazba proteinu 14-3-3 inhibuje katalytickou aktivitu ASK1-KD	61
5.1.3	Komplex pASK1-KD:14-3-3ζΔC je v roztoku konformačně heterogenní.....	62
5.1.4	Vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje konformaci aktivního místa ASK1-KD....	66

5.1.5 Vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje fluorescenční vlastnosti tryptofanového zbytku v aktivačním segmentu ASK1-KD	68
5.1.6 Diskuse	70
5.1.7 Shrnutí výsledků z publikace I	72
5.2 Role cysteinových zbytků při interakci thioredoxin-vazebné domény ASK1 a thioredoxinu (publikace II)	73
5.2.1 Význam Cys ³² v molekule TRX1 při interakci s ASK1-TBD.....	73
5.2.2 Význam cysteinových zbytků v molekule ASK1-TBD při interakci s TRX1	75
5.2.3 Diskuse	77
5.2.4 Shrnutí výsledků z publikace II	78
5.3 Interakce proteinu 14-3-3 s katalytickou doménou proteinkinasy CaMKK2 (publikace III)	79
5.3.1 CaMKK2 a protein 14-3-3 γ vytvářejí stabilní komplex se stechiometrií 1:2.	79
5.3.2 Vazba proteinu 14-3-3 nemá přímý inhibiční efekt na katalytickou aktivitu CaMKK2	81
5.3.3 Katalytická doména CaMKK2 v roztoku interaguje s 14-3-3 $\gamma\Delta$ C mimo centrální kanál.....	82
5.3.4 Diskuse	87
5.3.5 Shrnutí výsledků z publikace III.....	88
5.4 Vazba lidské prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3 vyžaduje dva fosforylační motivy (publikace IV)	89
5.4.1 Fosforylovaná prokaspasa-2 je v roztoku monomerní	89
5.4.2 Fosforylovaná prokaspasa-2 a 14-3-3 ζ tvoří stabilní komplex se stechiometrií 1:2	90
5.4.3 Vazba 14-3-3 ζ k prokaspase-2 vyžaduje současnou fosforylaci dvou 14-3-3 vazebných motivů.....	91
5.4.4 Diskuse	92
5.4.5 Shrnutí výsledků z publikace IV	93
6. Závěr.....	94
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	96
Přílohy.....	105

1. Úvod

Předkládaná práce je součástí výzkumných projektů laboratoří prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. na Přírodovědecké fakultě UK a RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D. na Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR, v.v.i., které spolu úzce spolupracují. V rámci práce byly studovány molekulární mechanismy regulace dvou vybraných signálních proteinkin a jedné proteasy v závislosti na protein-proteinových interakcích s jejich popsányými interakčními partnery, především s proteinem 14-3-3. Konkrétně byly studovány tři systémy významné jak z biologického tak lékařského hlediska:

- 1) Aktivace signální proteinkinasy ASK1 je klíčovým iniciačním dějem ke spuštění MAPK signální kaskády vedoucí k programované buněčné smrti. Dva z proteinů podílejících se na aktivaci ASK1 jsou její fyziologické inhibitory, thioredoxin 1 a protein 14-3-3, které interagují s neaktivní formou ASK1. Při oxidačním stresu dochází k disociaci thioredoxinu a proteinu 14-3-3 od molekuly ASK1 a k následné aktivaci enzymové aktivity.
- 2) CaMK signální dráha se účastní regulace mnoha fyziologických a patofyziologických procesů včetně energetické rovnováhy, glukosové homeostaze, vývoje neuronů, zánětu a rakoviny. Na začátku této signální kaskády stojí CaMKK2, na regulaci které se podílí protein 14-3-3. Úloha 14-3-3 v regulaci této proteinkinasy je však dosud zcela neznámá.
- 3) Lidská kaspasa-2 je cystein-dependentní aspartatovou proteasou, která hraje klíčovou roli při spuštění apoptosy a zánětlivých odpovědí. Prokaspasa-2 je jejím neaktivním prekursorem, který interaguje s proteinem 14-3-3 a prostřednictvím této interakce je blokována aktivace kaspasy-2, čímž je také blokována apoptosa.

Přestože jsou proteiny 14-3-3 středem vědeckého zájmu už řadu let, absence strukturních dat nedovoluje vysvětlit molekulární mechanismy, které jsou důležité pro pochopení podstaty změn vedoucích k aktivaci těchto signálních enzymů. Studium strukturních mechanismů doprovázejících aktivaci těchto enzymů je tedy nezbytné pro kompletní porozumění regulace apoptosy nebo jiné signalizace a vysvětlení patologických stavů s nimi spojených.

Tato disertační práce si klade za cíl pomocí různých biochemických a biofyzikálních metod přispět k objasnění strukturní podstaty výše popsaných dějů a vysvětlit úlohu protein-proteinových interakcí v jejich regulaci. Speciální pozornost bude věnována zejména strukturám proteinových komplexů s nízkým rozlišením a posuzování změn vazebných afinit na základě sedimentačních vlastností.

2. Literární přehled

2.1. Apoptosa

Programovaná buněčná smrt (apoptosa) je nevyhnutelná pro mnohobuněčné organismy při normálním vývinu a tkáňové homeostazi (Ellis *et al.*, 1991; Steller, 1995). Apoptosa ve zvýšené míře může vést k poruchám jako například neurodegenerativní onemocnění, zatímco nemoci jako například rakovina mohou být zapříčiněny nedostatečnou apoptosou (Rathmell a Thompson, 1999; Strasser *et al.*, 2000). Proces apoptosy zahrnuje komplexní kaskádu dějů, které můžeme rozdělit do dvou drah. Vnější dráha je iniciována podnětem z vnějšího prostředí a je započata vazbou ligandů smrti na receptory smrti (například Fas ligand a Fas receptor) nebo přítomností granzymu B na buněčném povrchu. Vnitřní dráha nastává jako důsledek buněčného stresu a je zprostředkována uvolněním cytochromu c z mitochondrií. Uvolnění cytochromu c do cytoplasmy je také využíváno jako amplifikační mechanismus pro vnější dráhu.

2.2 Proteinkinasy

Reversibilní fosforylace proteinů regulují téměř každý aspekt života buňky. Fosforylace a defosforylace moduluje proteinové funkce téměř jakýmkoliv způsobem, který si dokážeme představit. Například zvýšením nebo snížením jejich biologické aktivity, stabilizací nebo označením k degradaci a v neposlední řadě ke zprostředkování nebo destabilizaci protein-proteinových interakcí (Cohen, 2002).

Lehkost, flexibilita a reversibilita fosforylace v kombinaci s dostupností ATP jako donoru fosfátové skupiny vysvětluje, proč je fosforylace univerzálním regulačním mechanismem uplatňujícím se v eukaryotických buňkách. Odhadem 30% proteinů, které jsou kódované v lidském genomu, obsahuje kovalentně vázanou fosfátovou skupinu (Cohen, 2002).

Proteinkinasy zahrnují širokou skupinu enzymů, které katalyzují přenos fosfátové skupiny z gama pozice ATP na serinové, threoninové nebo tyrosinové aminokyselinové zbytky jejich proteinových substrátů. Na základě toho, na jakou skupinu přenos katalyzují, je můžeme rozdělit na serin-threoninové, tyrosinové proteinkinasy a na proteinkinasy s duální specificitou (Adams, 2001).

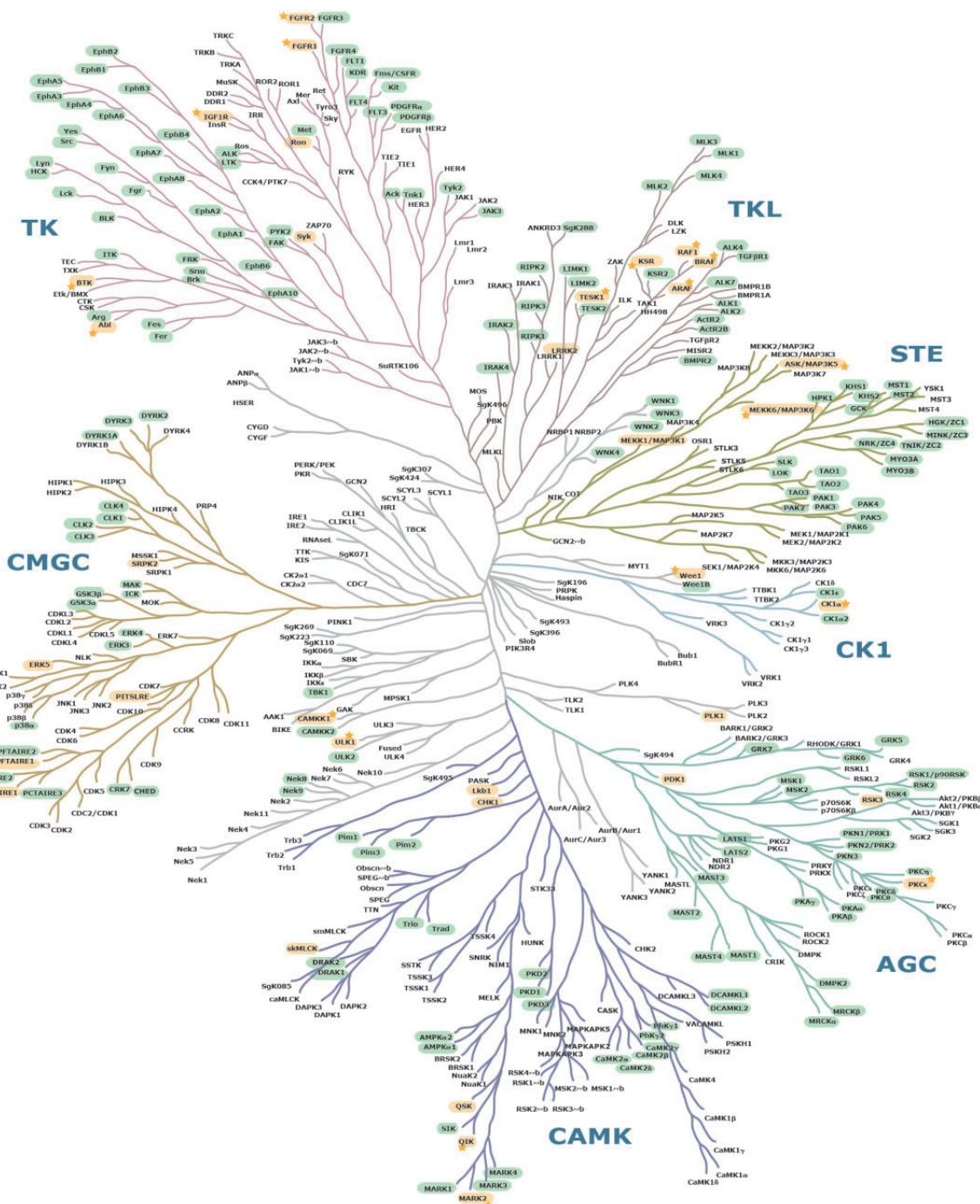
Proteinkinasy a fosfatasy zprostředkovávají většinu signální transdukce v eukaryotických buňkách prostřednictvím modifikace aktivity jejich substrátů. Oba tyto enzymy udržují rovnováhu ve fosforylačních stavech jejich proteinových substrátů a narušení této rovnováhy může vést k různým patologickým projevům. Mutace v genech pro tyto enzymy jsou velmi často příčinou nádorových onemocnění (Hunter, 2002).

Manning a kol. ve své práci (Manning *et al.*, 2002) identifikovali 518 genů pro proteinkinasy v lidském genomu. Tento soubor genů proteinkinas byl nazván lidským kinomem a odhadem tvoří 1,7% všech lidských genů (Hunter, 1987).

Většina proteinkinas patří do jedné velké superrodiny, která je charakteristická tím, že každý její člen obsahuje typickou proteinkinasovou katalytickou doménu (ePK: z angl. eukaryotic protein kinase). Kromě ePK proteinkinas existuje také 13 rodin s atypickou proteinkinasovou katalytickou doménou (aPK: z angl. atypical protein kinase, <http://kinase.com/human/kinome/>).

Dle práce Manning a kol. (Manning *et al.*, 2002) je lidský kinom rozdělen do 9 velkých skupin, 134 rodin a 196 podrodin (Obr. 2.1). Do devíti velkých skupin patří rodiny proteinkinas PKA/PKG/PKC (skupina AGC), skupina CaMK – Ca^{2+} /kalmomodulin-dependentní proteinkinasy, skupina CK1 - kaseinové kinasy, rodiny kinas CDK/MAPK/GSK3/CLK (skupina CMGC), skupina RGC – receptorové guanylát cyklasy, skupina STE – sterilní homologní kinasy, skupina TK- tyrosinkinasy, skupina TKL- kinasy podobné TK, atypické proteinkinasy a ostatní kinasy, které nepatří do žádné z uvedených skupin (atypické a ostatní proteinkinasy nejsou uvedeny na Obr. 2.1).

Selhání ve správné regulaci proteinkinas často bývá příčinou nebo důsledkem velkého množství lidských nemocí, proto jsou proteinkinasy zajímavým cílem pro vývoj léčiv (Cohen, 2002). Nicméně komplikovaná síť regulačních interakcí a mechanismus zpětné vazby mezi různými proteinkinasami má za následek, že specifické inhibitory proteinkinas mají často dalekosáhlejší následky, než se původně předpokládalo. Vzájemné interakce proteinkinas mohou také zprostředkovat mechanismy k získání rezistence k tomuto inhibitoru, proto jejich vývoj zůstává velkou výzvou (Graves *et al.*, 2013).

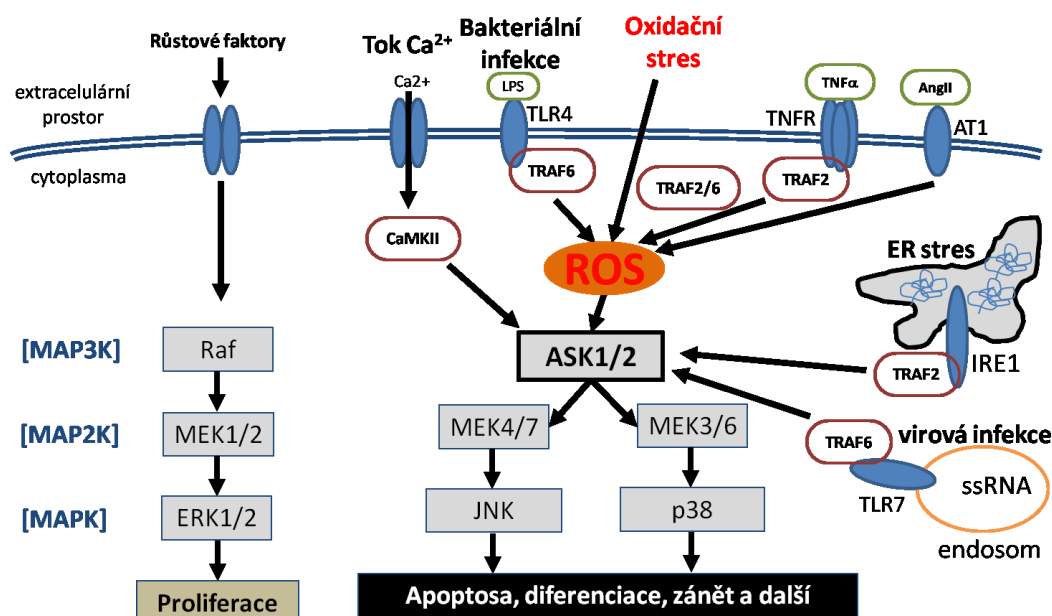


Obr. 2.1 Fylogenetický strom lidského kinomu s vyznačenými 14-3-3 vazebnými partnery. Zelenou barvou jsou vyznačeni kandidáti 14-3-3 vazebných partnerů určených pomocí serveru ANIA (<https://ania-1433.lifesci.dundee.ac.uk/prediction/webserver/index.py>). Žlutou barvou jsou vyznačeni experimentálně určení 14-3-3 vazební partneři. AGC – rodiny kinas PKA/PKG/PKC, CaMK – Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasy, CK1 – kaseinové kinasy, CMG – rodiny kinas CDK/MAPK/GSK3/CLK, STE – sterilní homologní kinasy, TK – tyrosinkinasy, TKL – kinasy podobné TK. Upraveno podle (Tinti *et al.*, 2014)

2.2.1 MAPK signální kaskády

Buňky jsou neustále vystavovány různým typům stresu vnějšího či vnitřního prostředí jako jsou např. oxidační stres zprostředkován ROS (z angl. reactive oxygen species), ozáření γ -paprsky, UV záření, stres endoplasmatického retikula (ER stres) a infekce. Adekvátní buněčná odpověď na tyto stresové podněty je důležitá pro udržení homeostasy (Hattori *et al.*, 2009).

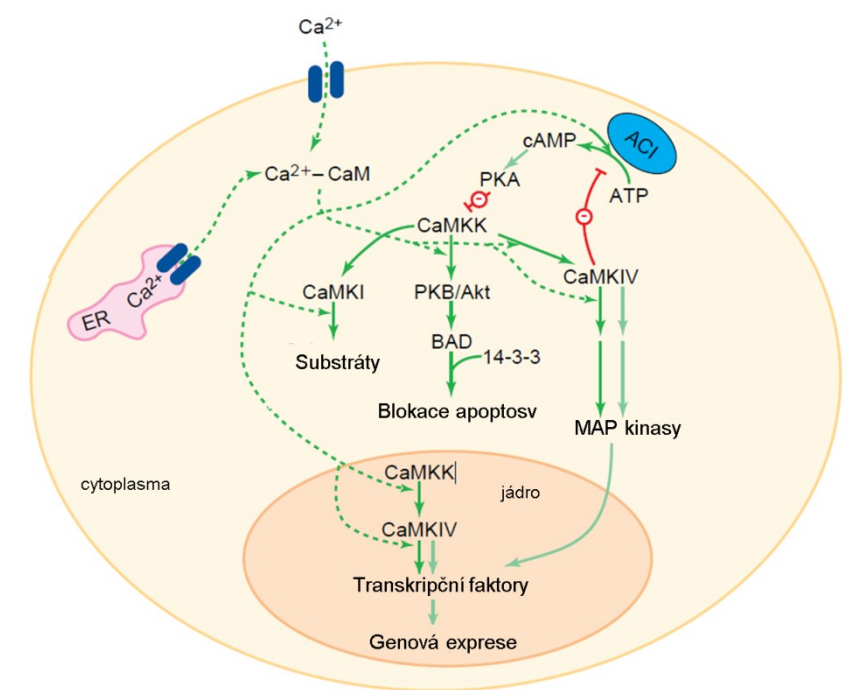
Mitogeny aktivované proteinkinasy (MAPK) jsou rodinou evolučně konzervovaných proteinkinas napříč všemi eukaryotickými buňkami a patří do skupiny proteinkinas STE (Obr. 2.1). MAPK signální kaskády byly vyvinuty za účelem obrany buňky proti buněčnému stresu. Všechny eukaryotické buňky mají víc MAPK signálních kaskád, přičemž každá z nich je přednostně aktivována jinou kombinací impulsů. Tento mechanismus buňce umožňuje adekvátně odpovědět v závislosti od buněčného kontextu (Kyriakis, 2001). MAPK tvoří tříúrovňový systém ve kterém MAPK kinasy kinasy (MAP3K) fosforylují a aktivují MAPK kinasy (MAP2K), které fosforylují a aktivují MAPK. Aktivované MAPK poté aktivují efektorové proteiny buněčné odpovědi (Dhillon *et al.*, 2007; Hayakawa *et al.*, 2012; Pearson *et al.*, 2001). Mezi tři nejznámější MAPK kaskády patří kaskády vedoucí k aktivaci ERK (z angl. extracellular signal-regulated kinases), JNK (c-Jun N-terminální kinasy) a p38 (Obr. 2.2).



Obr. 2.2 Přehled hlavních MAPK kinasových signálních kaskád. TRAF – z angl. TNF (Tumor Necrosis Factor) Receptor-Associated Factor, IRE1 – z angl. inositol-requiring enzyme 1, TLR4 – z angl. toll-like receptor 4, AT1 – angiotensinový receptor. Převzato z Hayakawa *et al.*, 2012.

2.2.2 Ca^{2+} /kalmodulin signální kaskády

Vnitrobuněčná koncentrace vápenatých iontů reguluje mnoho buněčných pochodů prostřednictvím proteinu kalmodulinu. Ten při navázání vápenatých iontů zvýší svou afinitu pro množství proteinů, které vážou kalmodulin včetně proteinkinas CaMK rodiny. CaMK signální dráha (Obr. 2.3) se účastní regulace mnoha fyziologických a patofyziologických procesů včetně energetické rovnováhy, glukosové homeostaze, vývoje neuronů a plasticity, zánětu a rakoviny (Racioppi a Means, 2012; Wayman *et al.*, 2008). Ca^{2+} /kalmodulin signální kaskády zahrnují tři hlavní kinasy. Na začátku stojí CaMKK (z angl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase), která po aktivaci fosforulyje a aktivuje CaMK (z angl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase), konkrétně CaMKI a CaMKIV. Tyto kaskády mají speciální význam v mozkových buňkách a T lymfocytech, ale samozřejmě jejich uplatnění najdeme také v řadě dalších typů buněk (Soderling, 1999).



Obr. 2.3 Schéma CaMK signální kaskády. CaM – kalmodulin, ACI – adenylát cyklasa. Zvýšená koncentrace vápenatých iontů vede k vytvoření komplexu Ca^{2+} /kalmodulin, který spouští celou škálu buněčných odpovědí. Upraveno dle Soderling, 1999.

2.3 Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou rodina kyselých dimerních proteinů, které jsou exprimovány ve všech eukaryotických buňkách (Aitken *et al.*, 1992). Proteiny 14-3-3 jsou vysoce konzervované napříč organizmy, přičemž některé jsou schopny exprimovat více isoform. Zatímco nižší eukaryota, např. kvasinky, ve svém genomu obsahují pouze dvě isoformy, vyšší eukaryota mají až 15 genů pro 14-3-3. U savců bylo zatím identifikováno sedm isoform (β , ε , η , γ , τ , ζ a σ). S výjimkou σ isoformy, všechny molekuly 14-3-3 jsou schopny tvořit jak homodimery tak heterodimery (Aitken *et al.*, 1995). Jejich zvláštní název odráží jejich konkrétní migrační obrazec na dvojdimenzionální DEAE-celulosové chromatografii a škrobové elektroforéze (Moore a McGregor, 1965).

2.3.1 Biologický význam proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 byly první identifikované molekuly, které mají schopnost specificky rozeznávat a vázat fosfoserinové nebo fosfothreoninové vazebné motivy (Yaffe a Elia, 2001), což nasvědčuje tomu, že se jedná o krajně důležité molekuly v regulaci signální transdukce. Později bylo ukázáno, že proteiny 14-3-3 jsou schopny vázat také nefosforylované motivy (Fu *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1997; Masters *et al.*, 1999). Díky široké škále vazebných partnerů, které proteiny 14-3-3 regulují, se proteiny 14-3-3 účastní mnoha buněčných pochodů jako např. regulace buněčného cyklu, iniciace apoptosy, kontroly metabolických dějů, a kontroly genové transkripce, neuroendokrinní transdukci a mnoho dalších (Freeman *et al.*, 2011; Gardino a Yaffe, 2011; Klein *et al.*, 2003). Funkce proteinů 14-3-3 mohou být obecně rozděleny na základě třech módů působení:

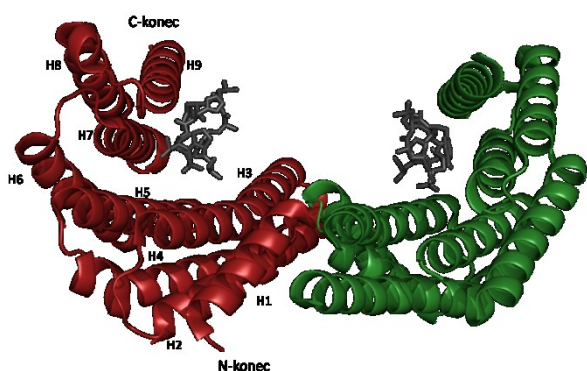
1. Přímá konformační změna vazebného partnera. Dimer proteinu 14-3-3 je velice rigidní molekula. Pokud je interakční partner méně rigidní protein, může protein 14-3-3 sloužit jako lešení, na kterém je tvarován cílový protein (Yaffe, 2002). Pokud je vazebným partnerem enzym, tato konformační změna může ovlivnit jeho enzymatické vlastnosti. Jako příklad tohoto módu lze uvést mechanismus regulace serotonin-N-acetyltransferasy (AANAT). Tento enzym je ve své volné formě katalyticky neaktivní hlavně díky nízké afinitě vůči substrátu. Po jeho fosforylaci dojde k vazbě proteinu 14-3-3 a ke stabilizaci katalytické oblasti AANAT, která je zapojená do vazby substrátu. Stabilizace této struktury zvyšuje afinitu k substrátu desetkrát (Ganguly *et al.*, 2001; Obsil *et al.*, 2001).

2. Fyzická okupace sekvenčně specifických nebo strukturních rysů. Protein 14-3-3 může také svojí vazbou maskovat důležité rysy na povrchu vazebného partnera. Například transkripční faktor FOXO (z angl. Forkhead-box transcription factor O) obsahuje jadernou lokalizační sekvenci v těsné blízkosti 14-3-3 vazebného motivu. Proto vazba 14-3-3 inhibuje interakci mezi jadernou lokalizační sekvencí a proteiny, které transportují tento protein do jádra, čímž je blokována jaderná lokalizace tohoto proteinu (Brunet *et al.*, 1999).

3. Protein 14-3-3 funguje jako adaptorový protein. Třetí možnou funkcí proteinů 14-3-3 je vystupovat jako adaptorová molekula, která stimuluje protein-proteinové interakce. Jednotlivé protomery proteinu 14-3-3 tak interagují každý s jiným interakčním partnerem, díky čemu jsou tyto dva vazební partneři udržováni v těsné blízkosti. Příkladem tohoto módu působení je interakce mezi Tau a glykogen synthasa kinasou 3 β (Agarwal-Mawal *et al.*, 2003).

2.3.2 Struktury proteinů 14-3-3 a jejich komplexů

První krystalové struktury isoformem ζ a τ odhalily, že proteiny 14-3-3 tvoří dimery s výrazně převládající helikální sekundární strukturou (Obr. 2.4; Liu *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1995). Monomer se skládá z 9 antiparalelních α -helixů. Molekula dimeru má charakteristický tvar šálku, který uvnitř ukrývá obrovský 35 Å dlouhý, 35 Å široký a 20 Å hluboký kanál a dva amfipatické žlábký pro vazbu ligandů. Aminokyselinové zbytky, jež jsou konzervované napříč různými isoformami se vyskytují na rozhraní dimeru a také vystylají vnitřní povrch šálku, zatímco větší variabilitu nalezneme na vnějším povrchu šálku. Největší sekvenční variabilitu mezi isoformami nalezneme v C-koncovém segmentu, který je nestrukturovaný a neviditelný ve všech dostupných strukturách.



Obr. 2.4 Krystalová struktura dimeru 14-3-3 ζ ve stuhové reprezentaci s navázaným fosfopeptidem sekvence ARSHpSYPA (tyčinková reprezentace) ve vazebných místech (PDB kód: 1QJA; Rittinger *et al.*, 1999).

2.3.3 Interakce proteinů 14-3-3

Rodina proteinů 14-3-3 vykazuje pleiotropické regulační efekty prostřednictvím vazby intracelulárních proteinů. Vzhledem k tomu, že proteiny 14-3-3 mají dvě vazebná místa, mohou vázat dva fosforylované motivy. Tyto dva 14-3-3 vazebné motivy se mohou v sekvenci vyskytovat buď blízko u sebe, nebo daleko od sebe. Často se stává, že se dva fosforylační motivy vyskytují v nestrukturovaných oblastech, kde protein 14-3-3 může indukovat konformační změnu tak, aby se úsek poskládal do 14-3-3 vazebné kavity (Johnson *et al.*, 2010; Yaffe, 2002; Silhan *et al.*, 2009; Yaffe *et al.*, 1997). Vazebná specifita proteinů 14-3-3 je dána celkovou sterickou komplementaritou a také sekvencí v okolí fosforylačního motivu.

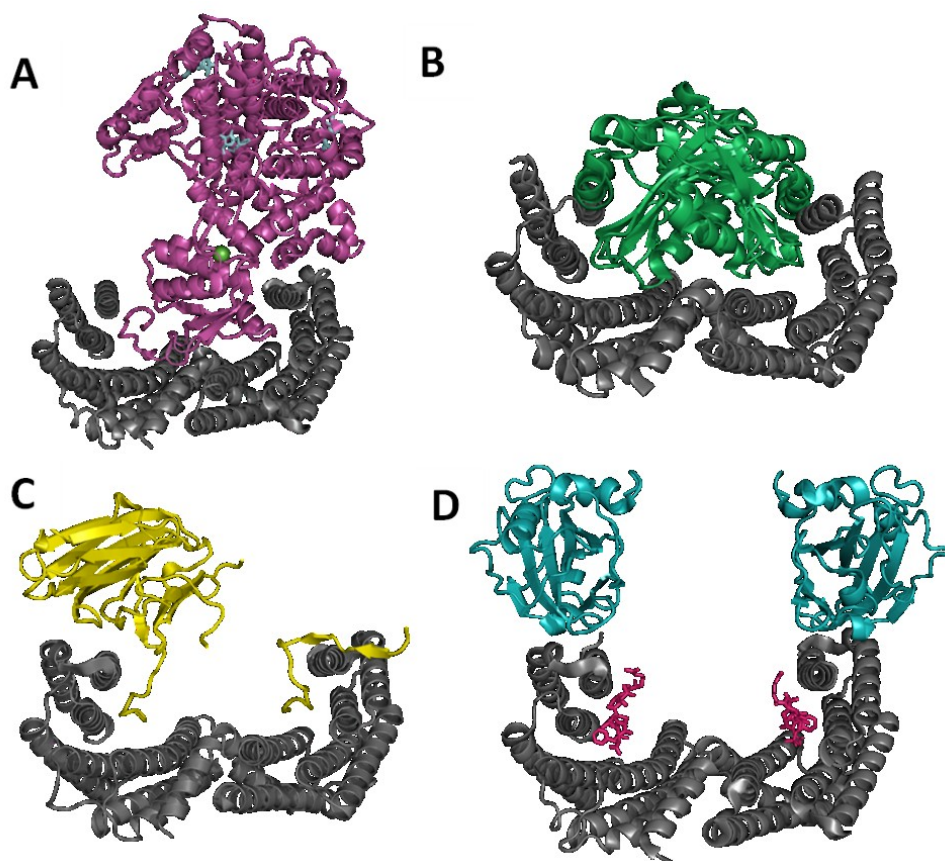
Experimentálně identifikováno bylo dosud víc než 300 vazebných partnerů, které budeme nazývat GS (z angl. „golden standards“). Analýza těchto GS partnerů odhalila, že existují dva konsenzuální vazebné motivy: R[S/Φ][+]pSXP (mód I) a RX[Φ/S][+]pSXP (mód II), kde pS je fosfoserinový zbytek, Φ je aromatický zbytek, + je bazický zbytek a X může být jakýkoliv zbytek (typicky Leu, Gly, Ala nebo Met; Rittinger *et al.*, 1999; Yaffe *et al.*, 1997). Později, byl identifikován také třetí konsenzuální vazebný motiv (pS/pT-X_{1,2}-COOH) (Ganguly *et al.*, 2005). Tyto motivy nejsou absolutní, vzhledem k tomu, že nezanedbatelné množství identifikovaných 14-3-3 vazebných partnerů obsahuje sekvence, které se značně liší od těchto optimálních motivů.

Nedávno bylo zjištěno, že relativně velkou skupinu mezi GS partnery lidského proteinu 14-3-3 tvoří tzv. 2R-ohnology. 2R-ohnology jsou členy rodiny dvou nebo čtyř proteinů, které byly vytvořeny díky dvěma cyklům duplikace celého genomu na začátku evoluce obratlovců v kambriu (Kasahara, 2013). Zatímco většina genů znásobeného genomu se časem zredukovala zpět na jednu kopii, 2R-ohnology si ponechaly svůj znásobený počet, a to především v případě genů kódujících signální proteiny (Huminiński a Heldin, 2010) a zvláště pak v případě vazebných partnerů proteinů 14-3-3 (Tinti *et al.*, 2012). U lidských 14-3-3 vazebných 2R-ohnologů bylo zjištěno, že primární vysokoafinitní 14-3-3 vazebný motiv je konzervován mezi všemi členy rodiny, zatímco sekundární nízkoafinitní místo se většinou liší (Tinti *et al.*, 2012). To inspirovalo vznik hypotézy, že dimery proteinů 14-3-3 mohly tvarovat evoluční divergenci 2R-ohnologů, jejichž jsou partnery. Spekuluje se, že vazba 14-3-3 ke konzervovaným primárním místům byla dostačující pro regulaci funkce členů 2R-ohnologové rodiny. Díky tomu mohlo

sekundární fosforylační místo podléhat další evoluci za vzniku motivu, který je fosforylován jinou proteinkinasou a vykazuje jinou vazebnou afinitu pro 14-3-3 (Tinti *et al.*, 2012; Huminiecki a Heldin, 2010; Green a Bronner, 2013).

Proteiny 14-3-3 se spoluúčastní na regulaci mnoha buněčných procesů s proteinkinasami dvěma způsoby. Některé proteinkinasy fosforylují fosforylační 14-3-3 vazebná místa 14-3-3 vazebných partnerů a jiné mohou být přímo jejich vazebnými partnery.

Tinti a kol. (Tinti *et al.*, 2014) vytvořili server ANIA, který predikuje 14-3-3 vazebné partnery. Mezi GS najdeme 28 2R-ohnologů a 9 neohnologních členů lidského kinomu (Obr 2.1, vyznačeno žlutou barvou; Tinti *et al.*, 2014). Z obrázku je patrné, že tito partneři jsou rovnoměrně distribuováni napříč celým lidským kinomem a zástupce najdeme v každé z rodin. Ačkoliv bylo doposud experimentálně určeno více než tři sta 14-3-3 vazebných partnerů, vyřešení struktur komplexů 14-3-3 s celými vazebnými partnery zůstává velkou výzvou. Doposud byly vyřešeny pouze čtyři takové struktury (Obr. 2.5), a to konkrétně pro protein 14-3-3 v komplexu s AANAT (Obsil *et al.*, 2001), pro komplex rostlinného proteinu 14-3-3 (GF14c) s florigenem Hd3a a fosforylovaným peptidem odvozeným od transkripčního faktoru OsFD1 (Taoka *et al.*, 2011), pro komplex neutrální trehalasy 1 s kvasničným analogem 14-3-3, proteinem Bmh1 (Alblova *et al.*, 2017) a pro komplex 14-3-3 s lidským malým Heat shock proteinem pHSPB6 (Sluchanko *et al.*, 2017).



Obr. 2.5: Známé krystalové struktury komplexů 14-3-3 proteinu. A) Krystalová struktura komplexu neutrální trehalasy 1 (fialově) s kvasničným analogem 14-3-3, proteinem Bmh1 (šedě; PDB kód: 5N6N; Alblova *et al.*, 2017). B) Krystalová struktura proteinu 14-3-3 (šedě) v komplexu s AANAT (zeleně; PDB kód: 1IB1, Obsil *et al.*, 2001). C) Krystalová struktura komplexu 14-3-3 (šedě) s lidským malým Heat shock proteinem pHSPB6 (žlutě; PDB kód: 5LTW; Sluchanko *et al.*, 2017). D) Krystalová struktura komplexu rostlinného proteinu 14-3-3 (GF14c, šedě) s florigenem Hd3a (modře) a fosforylovaným peptidem odvozeným od transkripčního faktoru OsFD1 (růžově; PDB kód: 3AXY; Taoka *et al.*, 2011).

2.4 Proteinkinasa ASK1

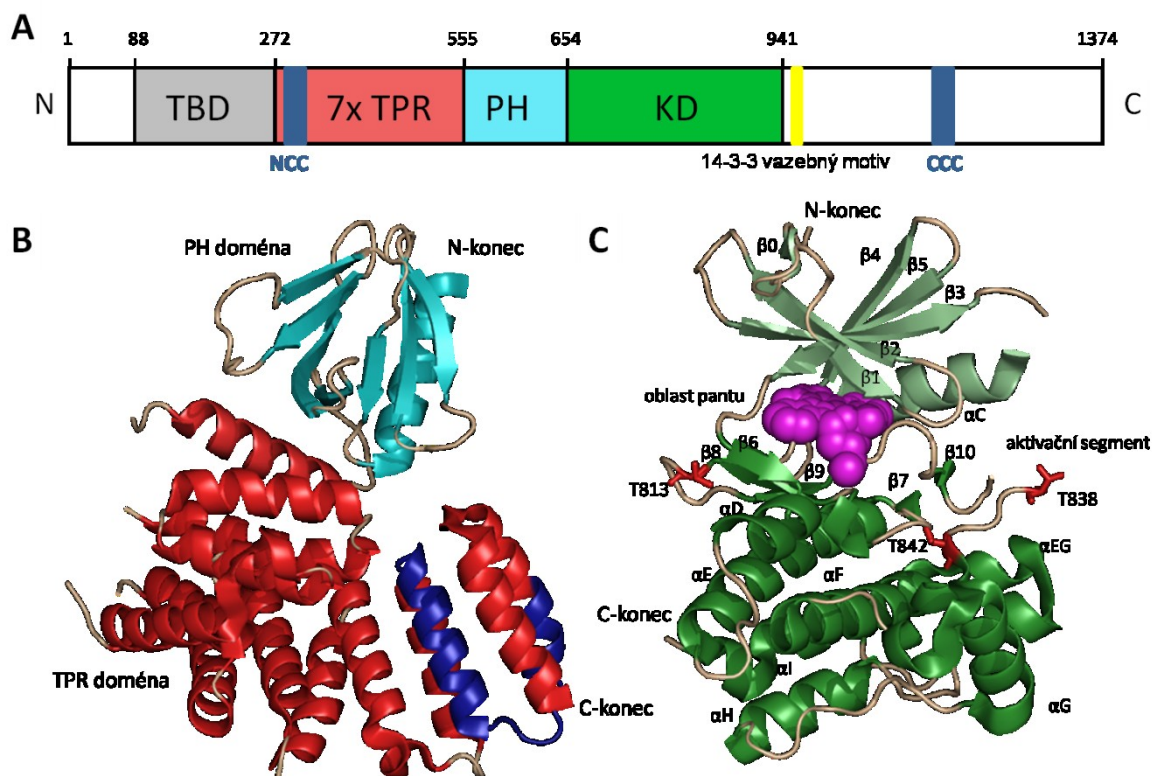
Proteinkinasa ASK1 (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1), neboli MAP3K5 (z angl. mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5) je členem MAP3K rodiny a stojí na začátku MKK4/7-JNK a MKK3/6-p38 signálních kaskád (Obr. 2.2; Ichijo *et al.*, 1997). K aktivaci proteinkinasy ASK1 dochází různými stresovými podněty, jako jsou například oxidační stres, stres endoplasmatického retikula, zvýšení vnitrobuněčné koncentrace vápenatých kationtů, přítomnost lipopolysacharidových molekul (LPS), přítomnost cytokinů (například TNF α), Fas ligandů, agonistů GPCR a dalších molekul imunitního systému (Saitoh *et al.*, 1998; Nishitoh *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 2000). Zvýšená exprese ASK1 může vyvolat apoptosu nebo cytokinovou

sekreci ale podle buněčného kontextu může také podporovat diferenciaci nebo přežití. ASK1 hraje významnou roli v detekci buněčné redoxní rovnováhy, a proto selhání správné regulace její aktivity je spojováno s množstvím různých nemocí, jako jsou například rakovina, cukrovka, neurodegenerativní či kardiovaskulární choroby (Kawarazaki *et al.*, 2014).

2.4.1 Struktura proteinkinasy ASK1

Lidská proteinkinasa ASK1 je polypeptid o délce 1374 aminokyselin a skládá se z N-koncové thioredoxin-vazebné domény (TBD), centrální regulační oblasti (CRR), serin/threoninové katalytické domény (KD) a „coiled-coil“ domén na N- (NCC) a C-koncích (CCC), které jsou důležité pro homooligomerizaci ASK1 (Obr. 2.6A; Tobiume *et al.*, 2002). Doposud byla vykrystalizována katalytická doména (sekvence 670–940) v komplexu se širokospektrálním proteinkinasovým inhibitorem – staurosporinem (Obr. 2.6C; Bunkoczi *et al.*, 2007) a relativně nedávno také centrální regulační oblast (sekvence 269–658; Obr. 2.6B; Weijman *et al.*, 2017).

Krystalová struktura ASK1-CRR obsahuje dvě domény - tetratrikopeptidovou doménu (TPR) a pak plekstrinovou homologní doménu (PH; Obr. 2.6A,B). TPR doména má kompaktní, globulární tvar a je složena ze čtrnácti α helixů, které tvoří sedm tetratrikopeptidových motivů. PH doména rozsáhle interaguje s motivy TPR6 a TPR7 skrze silně hydrofobní interakční povrch. To naznačuje, že by PH doména, která je v sekvenci hned vedle KD, mohla hrát klíčovou roli při vazbě substrátů ASK1, tedy MAP2K kinas, a tím i při jejich fosforylaci (Weijman *et al.*, 2017).

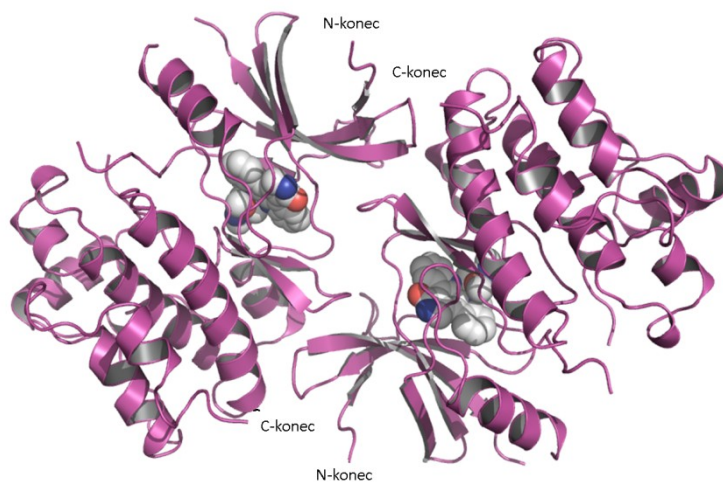


Obr. 2.6 Struktura lidské proteinkinasy ASK1. A) Doménová architektura ASK1. TBD - thioredoxin-vazebná doména, NCC - N-koncová „coiled-coil“ doména, TPR - tetratrikopeptidová doména, PH - plekstrinová homologní doména, KD - katalytická doména, CCC - C-koncová „coiled-coil“ doména. B) Krystalová struktura centrální regulační oblasti ASK1 ve stuhové reprezentaci (PDB kód: 5ULM; Weijman *et al.*, 2017). Červenou barvou je znázorněna TPR doména, ve které je modrou barvou vyznačena sekvence NCC a tyrkysovou barvou je znázorněna PH doména. C) Krystalová struktura katalytické domény ASK1 (PDB kód: 2CLQ; Bunkoczi *et al.*, 2007) ve stuhové reprezentaci v komplexu s inhibítor staurosporinem (růžová) zobrazeným jako sféry. Světlejší zelenou je znázorněn menší N-koncový lalok a tmavší barvou je znázorněn větší C-koncový lalok. Červeně jsou vyznačeny autofosforylační motivy Thr⁸¹³, Thr⁸³⁸ a Thr⁸⁴².

Struktura katalytické domény je velice podobná struktuře katalytických domén ostatních MAP kinas, obsahuje dva laloky (Obr. 2.6C). Malý N-koncový lalok (670–757) je tvořen pěti vlákny ve struktuře β -skládaného listu a jedním α -helixem (α C). Velký C-koncový lalok (761–940) obsahuje vlákna převážně ve struktuře α -helixu. Oblast pantu spojující tyto dva laloky lemují aktivní místo, do kterého se váže molekula ATP (v krystalové struktuře inhibitor staurosporin). Aminokyseliny, které se vyskytují v nestrukturované oblasti na začátku helixu α C (715–719) a v aktivním segmentu (831–837), nejsou viditelné na mapě elektronové hustoty. Na N-konci je krátké vlákno β_0 , které je připojeno k vláknu β_1 neobvykle dlouhým nestrukturovaným segmentem (675–684). Tento dlouhý segment může mít funkci při regulaci vazby ATP, poněvadž

určuje pozici segmentu, který váže fosfátový zbytek. Vlákno β_0 roztahuje síť antiparalelních vláken v N-koncovém laloku, čímž pravděpodobně dodává stabilitu této doméně (Bunkoczi *et al.*, 2007).

Bylo ukázáno, že izolovaná katalytická doména proteinkinasy ASK1 tvoří v roztoku relativně pevné dimery, jejichž zdánlivá disociační konstanta byla určena na hodnotu 0,22 ($\pm 0,2$) μM (Bunkoczi *et al.*, 2007). Tyto dimery najdeme také v rámci jejich asymetrické jednotky, kde je vidět jejich vzájemná orientace hlava-pata (N-koncová doména jednoho protomeru interaguje s C-koncovou doménou druhého protomeru a naopak; Obr. 2.7). Interakce mezi protomery je primárně založena na tvarové komplementaritě napříč velkým interakčním povrchem rozprostírajícím se téměř po celé délce protomeru. Dvě aktivní místa nalézáme na stejné straně blízko ekvatoriální roviny dimeru a jsou vzdáleny od sebe přibližně 20 Å (Bunkoczi *et al.*, 2007).



Obr. 2.7 Krystalová struktura dimeru ASK1-KD WT ve stuhové reprezentaci. Interakční povrch se rozprostírá téměř po celé délce monomeru ASK1. Oba protomery spolu interagují v orientaci hlava-pata. PDB kód: 2CLQ (Bunkoczi *et al.*, 2007).

Strukturní analýza aktivačního segmentu, který nebyl fosforylován v krystalové struktuře ASK1-KD, odhalila interakce, které napodobují strukturu aktivačního segmentu aktivovaných proteinkinas (Johnson *et al.*, 1996; Nolen *et al.*, 2004). Navíc izolovaná nefosforylovaná ASK1-KD je aktivní a je schopna sama sebe fosforylovat na autofosforylačních motivech v okolí threoninových zbytků Thr⁸¹³, Thr⁸³⁸ a Thr⁸⁴² (Obr. 2.6C). (Bunkoczi *et al.*, 2007). Mutantní varianty ASK1-KD, které měly všechny tři threoninové zbytky v autofosforylačních motivech zaměněné za alalinové zbytky, byly katalyticky aktivní, což naznačuje, že jejich fosforylace bude mít spíše význam při

interakcích s dalšími regulačními proteiny než přímou inhibicí katalytické aktivity ASK1 (Bunkoczi *et al.*, 2007).

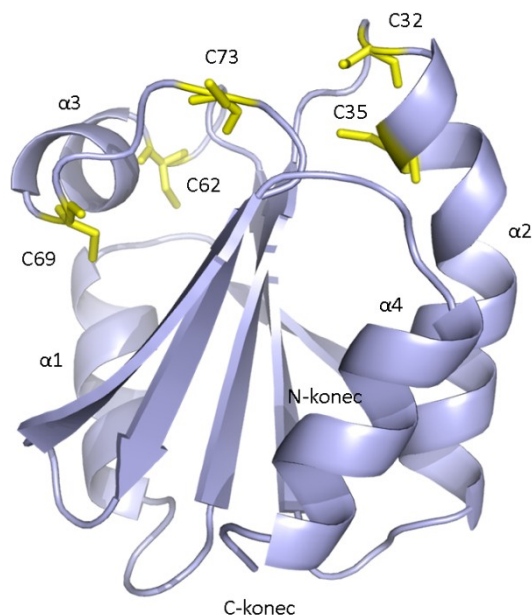
2.4.2 Interakce ASK1 s proteinem 14-3-3

Poprvé se začalo mluvit o funkční roli proteinu 14-3-3 v regulaci ASK1 v souvislosti se zjištěním, že za nestresových podmínek protein 14-3-3 ζ rozeznává motiv obsahující fosfoserinový zbytek pSer⁹⁶⁶, který je umístěn na C-konci katalytické domény ASK1 (Obr. 2.6A). Záměna tohoto serinového zbytku za alaninový dramaticky zvýšila míru buněčné smrti vyvolané ASK1 (Zhang *et al.*, 1999). Později bylo ukázáno, že defosforylace na pSer⁹⁶⁶ způsobena oxidačním stresem je doprovázena zvýšenou autokinasovou aktivitou ASK1, a že ASK1 mutant, který neváže 14-3-3 (ASK1 S966A), vykazoval zvýšenou jak autokinasovou, tak transkinasovou aktivitu (Goldman *et al.*, 2004). Nicméně molekulární mechanismus regulace ASK1 prostřednictvím proteinu 14-3-3 zůstává nejasný. Blízkost 14-3-3 vazebného motivu k ASK1-KD nabízí hypotézu, že protein 14-3-3 moduluje strukturu ASK1-KD nebo ovlivňuje přístupnost k aktivnímu místu, jak tomu je u jiných enzymů regulovaných prostřednictvím 14-3-3, jako například AANAT nebo neutrální trehalasa (Alblova *et al.*, 2017; Obsil *et al.*, 2001).

2.4.3 Interakce mezi ASK1 a thioredoxinem

Thioredoxiny (TRX) jsou třída malých thioloxidoreduktas, které jsou konzervované napříč organismy. Obstarávají různé biologické funkce včetně redukce disulfidických můstků proteinů v buněčných kompartmentech s redukčním prostředím, jsou zásobou oxidačně-redukčních ekvivalentů pro další oxidoreduktasy a regulují několik transkripčních faktorů a proteinů prostřednictvím přímé redukce jejich cysteinových zbytků nebo jinými mechanismy (Hanschmann *et al.*, 2013). Jsou známy dvě isoformy TRX. Isoforma TRX1 se vyskytuje převážně v cytoplasmě a v jiných buněčných kompartmentech vyžadujících redukční prostředí. Isoforma TRX2 se vyskytuje převážně v mitochondriích, kde se kromě udržování oxidačně-redukční rovnováhy také účastní regulace membránového potenciálu (Zhang, 2004). Molekula TRX1 se skládá z pěti vláken se strukturou β -skládaného listu, které tvoří hydrofobní jádro obklopené čtyřmi helixy (Obr. 2.8). Sekvence savčího TRX1 obsahuje pět cysteinových zbytků, přičemž dva z nich (Cys³² a Cys³⁵) jsou součástí vysoce konzervovaného katalytického motivu W³¹CGPC³⁵,

ve kterém tyto cysteinové zbytky poskytují thiolové skupiny zodpovědné za redoxní aktivitu (Holmgren *et al.*, 1975).



Obr. 2.8 Krystalová struktura redukovaného TRX1 ve stuhové reprezentaci. Cysteinové zbytky jsou vyznačeny žlutou barvou, PDB kód: 1ERT (Weichsel *et al.*, 1996).

Za nestresových podmínek je aktivita ASK1 inhibována skrze asociaci s TRX1, který se váže k thioredoxin-vazebné doméně proteinkinasy ASK1 (ASK1-TBD, Obr. 2.6; Saitoh *et al.*, 1998). ASK1-TBD se vyskytuje na N-konci proteinu (46–277) a její třírozměrná struktura je zatím neznámá (Fujino *et al.*, 2007). Bylo ukázáno, že ASK1-TBD je monomerní protein, který se v redukčních podmínkách váže k TRX1 s molární stechiometrií 1:1 skrze relativně rozsáhlý interakční povrch bez výrazné změny konformace obou partnerů při vytvoření vazby. Navíc bylo ukázáno, že při interakci není mezi molekulami vytvořen disulfidický můstek, jedná se tedy čistě o nekovalentní interakci (Kosek *et al.*, 2014). Při oxidačním stresu thioredoxin disociuje od molekuly ASK1, což vede k její aktivaci (Fujino *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2000). Pokusy s neaktivní mutantní variantou TRX1 (mutant s oběma katalytickými cysteinovými zbytky Cys³² a Cys³⁵ nahrazenými serinovými zbytky) a oxidovanou formou TRX1 WT ukázaly, že tyto varianty nejsou schopny vázat ASK1 (Fujino *et al.*, 2007; Liu a Min, 2002; Saitoh *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004). To znamená, že se katalytické cysteinové zbytky nejspíš účastní interakce mezi TRX1 a ASK1-TBD a že tvorba intramolekulárního disulfidického můstku mezi těmito zbytky by při oxidaci mohla být jedním z hlavních faktorů disociace TRX1 od ASK1, bez ohledu na enzymovou aktivitu TRX. Nicméně molekulární mechanismus

disociace komplexu ASK1-TBD:TRX1 při oxidačním stresu pořád není zcela jasný, mimo jiné také kvůli nedostatku strukturních dat o ASK1-TBD. Například není jasné, který z katalytických cysteinových zbytků TRX1 (Cys³² a Cys³⁵) je klíčový pro interakci s ASK1 a jestli je tvorba cystinového můstku mezi Cys³² a Cys³⁵ TRX1 jediným faktorem zodpovědným za disociaci komplexu při oxidačním stresu. Bylo ukázáno, že cysteinové zbytky Cys⁶² a Cys⁶⁹, které nejsou součástí aktivního místa TRX1, tvoří druhý cystinový můstek při oxidačních podmínkách (Watson *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2011), ale jestli ten hraje roli při disociaci TRX1 od ASK1 není známé. Mutace Cys²⁵⁰ v sekvenci ASK1 významně ovlivňuje interakci mezi ASK1 a TRX1, což naznačuje, že tento cysteinový zbytek je buď přímo zapojený do vazby nebo má vliv na stabilitu ASK1-TBD (Zhang, 2004; Nadeau *et al.*, 2009; Kosek *et al.*, 2014). Kromě Cys²⁵⁰, ASK1-TBD obsahuje ještě šest dalších konzervovaných cysteinových zbytků. Proto je zcela možné, že by oxidace ASK1-TBD mohla také přispívat k disociaci komplexu ASK1:TRX1.

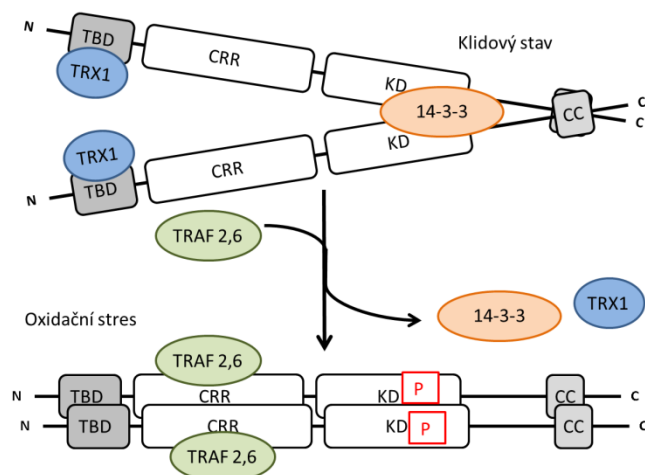
2.4.4 Současný model regulace aktivity ASK1

Dle současného modelu regulace aktivity ASK1 je tato proteinkinasa za nestresových podmínek součástí komplexu s vysokou molekulovou hmotností, tzv. ASK1 signalosomu (>1500 kDa), ve kterém je ASK1 homooligomerizovaná prostřednictvím C-koncového tzv. „coiled-coil“ (CCC) motivu a interaguje s několika dalšími molekulami, například ASK2, TRX1 a 14-3-3 (Tobiume *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 2005; Cockrell *et al.*, 2010). Thioredoxin se váže k ASK1-TBD a je při tom předpokládáno, že tímto způsobem je blokována homooligomerizace ASK1 prostřednictvím N-koncové oblasti její molekuly (Fujino *et al.*, 2007).

Protein 14-3-3 se váže k C-koncovému 14-3-3 vazebnému motivu, kde inhibuje katalytickou aktivitu ASK1 prostřednictvím zatím neznámého mechanismu (Cockrell *et al.*, 2010; Saitoh *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Goldman *et al.*, 2004; Liu a Min, 2002). Při odpovědi na oxidační stres, TRX1 a 14-3-3 disociují od ASK1 signalosomu a poté dochází k navázání TRAF2 a TRAF6 (z angl. tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 a 6) k ASK1-CRR (Goldman *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2000; Noguchi *et al.*, 2005) a dojde k autofosforylaci na threoninovém zbytku Thr⁸³⁸ v aktivačním segmentu ASK1, čímž se ASK1 stává aktivní proteinkinásou (Obr. 2.9; Fujino *et al.*, 2007; Noguchi *et al.*, 2005; Tobiume *et al.*, 2002; Weijman *et al.*, 2017). Donedávna se předpokládalo, že molekula ASK1, kromě C-koncového „coiled-coil“ motivu, obsahuje druhý N-koncový

„coiled-coil“ motiv (NCC, Obr. 2.6A), který je zodpovědný za homooligomerizaci N-koncové oblasti ASK1 při disociaci TRX1 od ASK1-TBD (Fujino *et al.*, 2007). Nicméně krystalová struktura ASK1-CRR (Obr. 2.6B) odhalila že, N-koncová oblast, ve které byla předpověděna existence NCC motivu (297–324, 2.6A,B; vyznačeno modrou barvou) je součástí TPR domény, která se účastní velkého množství kontaktů s TPR helixy (Weijman *et al.*, 2017). Proto ačkoliv tato oblast hraje důležitou roli při aktivaci ASK1 (Fujino *et al.*, 2007), nebude pravděpodobně zprostředkovávat klasickou „coiled-coil“ interakci. Navíc tři studované fragmenty ASK1 v práci od Weijman a kol. (269–658, 88–658 a 88–941) se jeví v roztoku jako monomerní, což naznačuje, že za homooligomerizaci N-koncové oblasti ASK1 při její aktivaci bude nejspíše zodpovědný jiný mechanismus (Weijman *et al.*, 2017). Disociace TRX1 a vazba TRAF způsobené oxidačním stresem, společně s homooligomerizací N-koncové oblasti ASK1, pravděpodobně otevírají uzavřenou, inhibovanou strukturu ASK1, čímž je umožněna autofosforylace zbytku Thr⁸³⁸ a asociace se substráty MAP2K (Fujino *et al.*, 2007; Noguchi *et al.*, 2005; Tobiume *et al.*, 2002; Weijman *et al.*, 2017).

Diskutabilní je zde také dimerizace samotné ASK1-KD (která je nezávislá na CCC) a její příspěvek k ASK1 oligomerizaci v rámci signalosomu (Obr. 2.7; Bunkoczi *et al.*, 2007). Jak již bylo zmíněno, větší konstrukty ASK1 obsahující KD společně s CRR a TBD byly v roztoku monomerní (Weijman *et al.*, 2017). Můžeme spekulovat, že tyto větší fragmenty zůstávají v monomerní formě, protože jejich dimerizační povrch je maskován ASK1-CRR nebo ASK1-TBD. Navíc ASK1 může tvořit heterooligomery s její blízkou příbuznou proteinkinasou ASK2 (MAP3K6) uvnitř signalosomu. Všechny zbytky, které nacházíme na interakčním povrchu dimeru ASK1-KD jsou konzervované mezi těmito dvěma proteinkinasy, což naznačuje že ASK1-KD a ASK2-KD mohou být uspořádány podobným způsobem (Cockrell *et al.*, 2010; Federspiel *et al.*, 2016; Takeda *et al.*, 2007). Proto je možné, že ASK1-KD homo nebo heterodimerizace může přispět k oligomerizaci ASK1 uvnitř signalosomu způsobem závislým na konformaci celé molekuly ASK1.



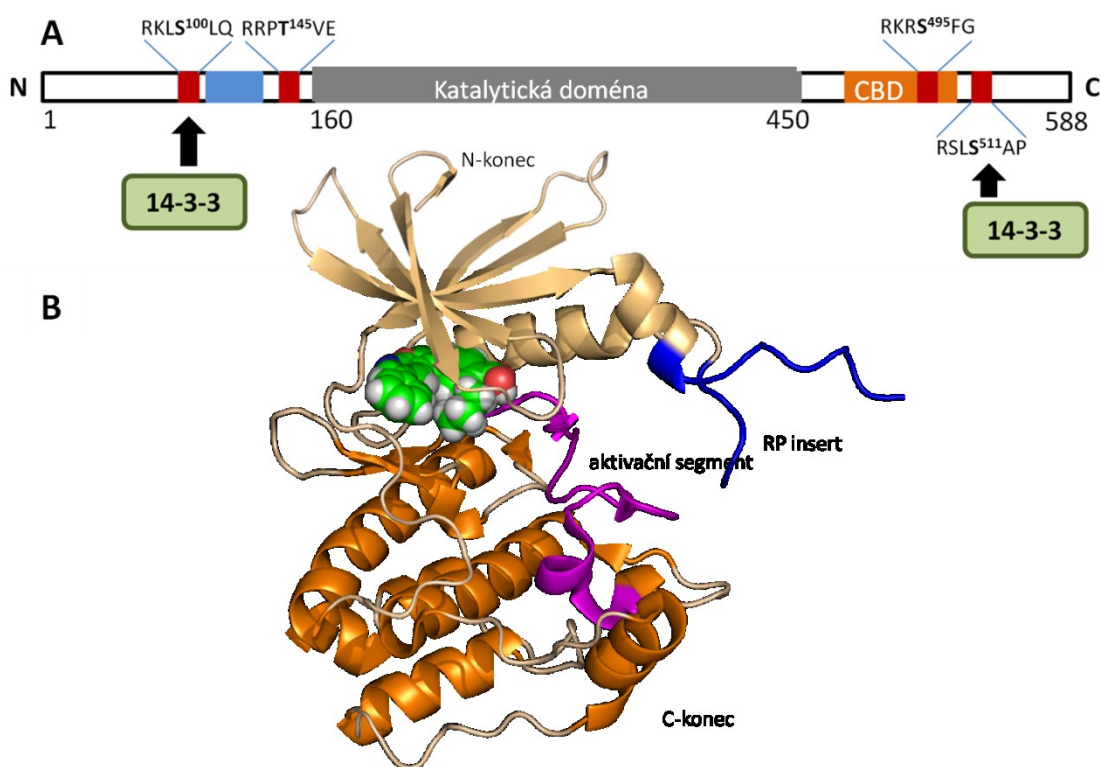
Obr. 2.9 Návrh mechanismu aktivace proteinkinasy ASK1 vyvolané ROS. Za nestresových podmínek je ASK1 homooligomerizovaná prostřednictvím svých C-koncových „coiled-coil“ domén. Thioredoxin a protein 14-3-3, dva fyziologické inhibitory ASK1, jsou navázány a brání homooligomerizaci prostřednictvím N-koncové oblasti ASK1. Při oxidačním stresu molekuly TRX1 a 14-3-3 disociují od ASK1 signalosomu a následně se k signalosomu připojí proteiny TRAF2 a TRAF6. Dochází k homooligomerizaci ASK1 prostřednictvím její N-koncové oblasti, díky čemu se katalytické domény dostávají do vzájemné blízkosti a dochází k jejich autofosforylaci a k plné aktivaci ASK1. CC – „coiled-coil“ doména, P – fosfatový zbytek.

2.5 Proteinkinasa CaMKK2

Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasakiny (CaMKK) jsou členy rodiny Ca^{2+} /kalmodulin-dependentních proteinkinas (CaMK), které specificky fosforylují threoninové zbytky uvnitř aktivačního segmentu dvou substrátů, CaMKI a CaMKIV a zvyšují tak jejich katalytickou aktivitu (Haribabu *et al.*, 1995). U savců se vyskytují dvě různé isoformy CaMKK, CaMKK1 a CaMKK2, přičemž obě jsou ve velké míře exprimovány v mozku, ale najdeme je také v buňkách jiných tkání. (Edelman *et al.*, 1996) Jejich sekvence vykazují 65% identitu a 80% podobnost (Anderson *et al.*, 1998). CaMKK2 je jednou z nejvšestrannějších CaMK, účastní se při regulaci neuronové plasticity, diferenciaci adipocytů, glukosové homeostasy, hematopoézy, zánětu či rakoviny a je proto slibným cílem terapeutického zásahu (Racioppi a Means, 2012). Navíc bylo ukázáno, že jedním z dalších substrátů CaMKK2 je AMP-aktivovaná proteinkinasa (AMPK) (Hawley *et al.*, 2005; Hurley *et al.*, 2005), a tak CaMKK2 hraje také významnou roli v regulaci energetické rovnováhy (Anderson *et al.*, 2008).

2.5.1 Struktura proteinkinasy CaMKK2

Podobně jak je tomu u dalších členů CaMK rodiny, CaMKK2 se skládá z N-koncové serin/threoninové katalytické domény (KD) následované C-koncovou autoinhibiční doménou (AID), která se překrývá s kalmodulin-vazebnou doménou (CBD; Obr. 2.10A; Kukimoto-Niino *et al.*, 2011). Lidská isoforma CaMKK2 je protein o velikosti přibližně 65 kDa a je relativně dobře konzervovaná napříč druhy (Racioppi a Means, 2012). U CaMKK isoform byla dosud vykrytalizovaná pouze struktura katalytické domény (158–448) lidské CaMKK2 v komplexu s inhibitemr STO-609 (Obr. 2.10B; Kukimoto-Niino *et al.*, 2011).



Obr. 2.10 Struktura lidské proteinkinasy CaMKK2. (A) Doménová architektura lidské CaMKK2. Na obrázku jsou vyznačeny důležité regulační prvky její struktury: N-terminální regulační segment, nezbytný pro autonomní aktivitu CaMKK2 (modrá), katalytická doména (šedá) a CBD (oranžová). (B) Krystalová struktura katalytické domény CaMKK2 (158–448) ve stuhové reprezentaci v komplexu s inhibitorem 8R4 (kuličkový model). Světlejší oranžovou je znázorněn menší N-koncový lalok a tmavší barvou je znázorněn větší C-koncový lalok. Modrou barvou je vyznačen tzv. RP-insert a fialovou barvou aktivační segment. PDB kód: 5UY6 (Kukimoto-Niino *et al.*, 2011).

Katalytická doména CaMKK2 je velice podobná struktuře katalytických domén ostatních proteinkinas (viz Obr. 2.6C), ale vykazuje několik zajímavých strukturních odlišností ve srovnání s ostatními CaM kinasami. Skládá se z N-koncového laloku, který je tvořen především strukturou β -skládaného listu a C-koncového laloku, který obsahuje vlákna tvořena hlavně α -helikální strukturou. Inhibitor STO-609 se váže v ATP-vazebném místě, jedná se tedy o ATP kompetitivní inhibici. Tzv. RP-insert (204–226, Obr. 2.10B, vyznačeno modrou barvou), bohatý na aminokyselinové zbytky Arg, Pro a Gly, který je charakteristický pro obě CaMKK isoformy, nebyl viditelný na mapě elektronové hustoty, což naznačuje, že se bude pravděpodobně jednat o velice flexibilní segment. Tento úsek bude hrát pravděpodobně klíčovou roli při rozpoznávání substrátů, vzhledem k tomu, že jeho delece způsobila kompletní ztrátu katalytické aktivity CaMKK (Tokumitsu *et al.*, 1999). C-koncový lalok postrádá helix α D, který se nachází u CaMKI i CaMKII, kde interaguje s AID. Namísto tohoto úseku se zde nachází smyčka β 5- α E, která definuje hydrofobní povrch důležitý pro vazbu substrátu (Kukimoto-Niino *et al.*, 2011).

U většiny proteinkinas je fosforylace na jejich aktivačním segmentu vyžadována ke změně konformace v aktivní formu (Johnson *et al.*, 1996; Nolen *et al.*, 2004). Aktivační segment je u CaMKK2 lokalizován v úseku 330–357 (Obr. 2.10B, vyznačeno fialovou barvou) a obsahuje ve své sekvenci jeden threoninový a jeden serinový zbytek. Nicméně krystalová struktura CaMKK2 odhalila, že ačkoliv ani jeden z výše zmíněných potenciálních fosforylačních motivů nebyl fosforylován, aktivační segment vykazoval aktivní konformaci. To naznačuje, že CaMKK2 pravděpodobně nevyžaduje fosforylaci na aktivačním segmentu pro dosažení aktivní konformace. Pro ověření této hypotézy byla měřena katalytická aktivita katalytické domény CaMKK2 (158–448) v přítomnosti syntetického peptidového substrátu a tento konstrukt byl aktivní bez fosforylace na jeho aktivačním segmentu (Kukimoto-Niino *et al.*, 2011).

2.5.2 Regulace aktivity CaMKK

Přestože isoformy CaMKK1 a CaMKK2 sdílejí velkou sekvenční podobnost a identitu, liší se svými biochemickými vlastnostmi. Zatímco aktivita CaMKK1 je přísně regulována autoinhibiční doménou a vazba komplexu Ca^{2+} /kaldmodulin ruší tuto autoinhibici, CaMKK2 vykazuje signifikantní autonomní aktivitu v nepřítomnosti komplexu Ca^{2+} /kaldmodulin. Regulace CaMKK2 je spjata s fosforylací na různých místech

molekuly, což rozhoduje o její autonomní aktivitě i v nepřítomnosti komplexu Ca^{2+} /kaldmodulin (Anderson *et al.*, 1998). Tato autonomní aktivita je regulována fosforylačním statusem na N-koncové regulační doméně (130–152, Obr. 2.10A, vyznačeno modrou barvou), jehož delece u potkaní CaMKK2 zapříčinila kompletní závislost na regulaci pomocí vazby komplexu Ca^{2+} /kaldmodulin (Tokumitsu *et al.*, 2001). Tato N-koncová regulační oblast obsahuje tři fosforylační motivy v pozicích Ser¹²⁹, Ser¹³³ a Ser¹³⁷, které jsou motivy pro cyklin-dependentní kinasu 5 a glycogen synthasa kinasu 3 (Green *et al.*, 2011; Wayman *et al.*, 1997).

Komunikace mezi CaMK kaskádami a signálními dráhami zahrnujícími PKA kinasu umožňuje regulaci aktivity CaMKK pomocí dalšího mechanismu. Ukázalo se, že obě isoformy CaMKK jsou částečně inhibovány PKA fosforylací na několika místech (Wayman *et al.*, 1997; Matsushita *et al.*, 1999; Okuno *et al.*, 2001). CaMKK1 obsahuje ve své sekvenci pět PKA fosforylačních motivů, Ser⁵², Ser⁷⁴, Thr¹⁰⁸, Ser⁴⁵⁸, a Ser⁴⁷⁵, přičemž čtyři z nich se vyskytují také v sekvenci CaMKK2 (Ser¹⁰⁰, Thr¹⁴⁵, Ser⁴⁹⁵, a Ser⁵¹¹; Obr. 2.10A). Fosforylace na Ser⁴⁵⁸ blokuje vazbu komplexu Ca^{2+} /kaldmodulin, zatímco fosforylace na Thr¹⁰⁸ hraje roli v regulaci aktivity CaMKK1 vzhledem k substrátům CaMKI a CaMKIV (Wayman *et al.*, 1997; Kitani *et al.*, 2001). Nedávná studie (Nakanishi *et al.*, 2017) ukázala, že zpětná fosforylace zbytku Thr¹⁴⁵ substrátem AMPK inhibuje autonomní aktivitu potkaní CaMKK2 bez žádného výrazného vlivu na aktivitu závislou od přítomnosti komplexu Ca^{2+} /kaldmodulin.

2.5.3 Interakce CaMKK s proteinem 14-3-3

Kromě přímé inhibice prostřednictvím fosforylace PKA proteinkinasou, aktivita CaMKK1 je dále regulována mechanismem založeným na interakci proteinu 14-3-3 s PKA fosforylovanými 14-3-3 vazebnými motivy (Davare *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2008). Sekvence CaMKK kinas obsahují dva 14-3-3 vazebné motivy (Davare *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2008). Motiv obsahující fosforylovaný Ser⁷⁴ (odpovídá Ser¹⁰⁰ u CaMKK2) uvnitř N-koncové domény CaMKK1 byl identifikován (Davare *et al.*, 2004) jako primární vysokoafinitní místo zodpovědné za vazbu na protein 14-3-3, přičemž CaMKK1 preferuje isoformy η a γ . Později byl identifikován druhý 14-3-3 vazebný motiv u CaMKK1 (Ichimura *et al.*, 2008) obsahující Ser⁴⁷⁵ (Ser⁵¹¹ u CaMKK2) v sekvenci vyskytující se za C-koncovými AID a CBD. Fosforylace tohoto motivu proteinkinasou PKA je ale pouze jen částečná a objevuje se hlavně v přítomnosti komplexu Ca^{2+} /kaldmodulin (Matsushita *et al.*,

1999; Okuno *et al.*, 2001; Davare *et al.*, 2004). Funkční role vazby proteinu 14-3-3 v regulaci CaMKK je evidentně dvojaká. Davare a kol. (Davare *et al.*, 2004) ve své práci navrhli, že vazba proteinu 14-3-3 inhibuje CaMKK1 prostřednictvím dvou mechanismů, hlavně prostřednictvím inhibice defosforylace threoninového zbytku Thr¹⁰⁸, čímž je CaMKK1 udržována v inhibovaném stavu zprostředkovaném PKA fosforylací, ale také přímou inhibicí katalytické aktivity. Ichimura a kol. (Ichimura *et al.*, 2008) ukázali, že vazba proteinu 14-3-3 snižuje maximální rychlost V_{\max} CaMKK1, čili 14-3-3 by mohl fungovat jako alosterický modulátor CaMKK1. Nicméně molekulární mechanismus této interakce stejně tak jako role 14-3-3 v regulaci CaMKK2 zůstávají nejasné.

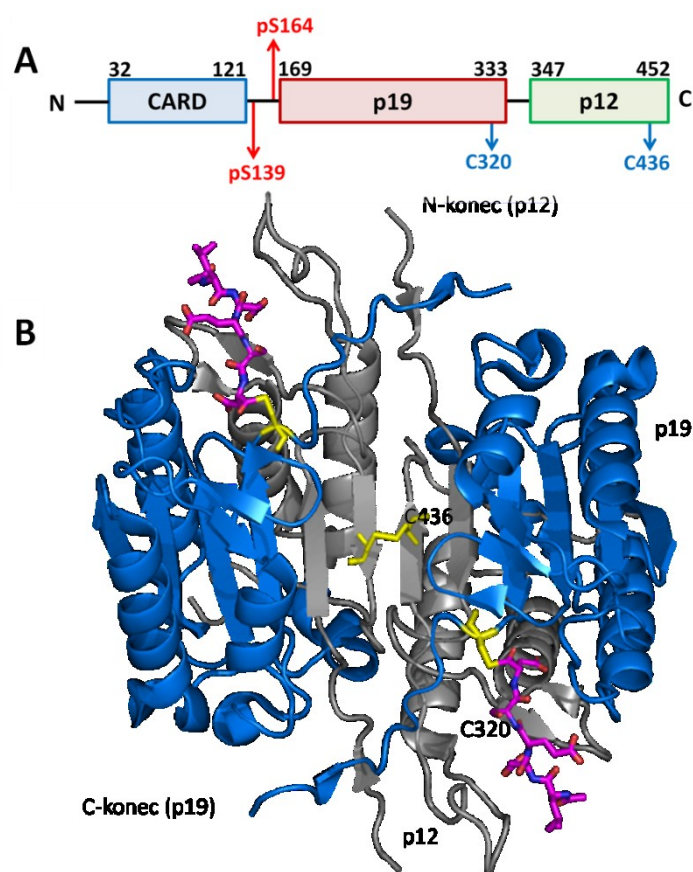
2.6 Kaspasa-2

Kaspasy jsou rodina cystein-dependentních aspartatových proteas, které hrají klíčovou roli při spouštění apoptosy a zánětlivých odpovědí (Pop a Salvesen, 2009). Kaspasy můžeme podle jejich pozice v apoptotické hierarchii rozdělit do dvou tříd: iniciační a efektorové kaspasy. Iniciační kaspasy (např. kaspasa-2, -8 a -9) stojí na začátku aktivačních apoptotických kaskád a jsou aktivovány dimerizací, která zahrnuje vazbu adaptorových proteinů ke kaspasové prodoméně (Danial a Korsmeyer, 2004). Aktivované iniciační kaspasy štěpí a aktivují efektorové kaspasy, které zahajují apoptosu.

Kaspasa-2 (C2) je jednou z evolučně nejkonzervovanějších kaspas a bylo ukázáno, že ovlivňuje několik procesů účastnících se při rozvoji rakoviny (Kumar, 2009; Miles *et al.*, 2017). Kaspasa-2 je iniciační kaspasou a struktura jejího zymogenu (prokaspasy-2) se skládá z N-koncové kaspasové aktivační a rekrutační domény (CARD), velké podjednotky (p19) a malé podjednotky (p12; Obr. 2.11A; Duan a Dixit, 1997). Bylo zjištěno, že kaspasa-2 může být spouštěčem jak vnitřní, tak i vnější apoptotické dráhy (Troy a Shelanski, 2003). První funkce, se kterou byla tato proteasa spojována, byla iniciace vnější apoptotické dráhy. V rámci této dráhy dochází po vazbě ligandu na příslušný receptor (např. Fas ligandu na Fas receptor) k vytvoření komplexu mezi receptorem a adaptorovým proteinem RAIDD (RIP-asociovaný Ich-1/CED-3 homologní protein s death doménou, který je znám také jako tzv. CRADD). Na tento komplex se následně váže prokaspasa-2 prostřednictvím její N-koncové CARD domény (Baliga *et al.*, 2004; Duan a Dixit, 1997; Tinel a Tschopp, 2004). V tomto komplexu je prokaspasa-2 aktivována proteolytickým štěpením, čímž je do cytoplasmu uvolněná aktivní kaspasa-2 (Obr. 2.11B). Ta potom štěpí cytosolický protein Bid, který má za následek zvýšenou permeabilitu vnější

mitochondriální membrány, díky čemuž je do cytoplasmu uvolněn cytochrom c, který asociuje s prokaspasou-9 a Apaf-1, které tvoří tzv. apoptosom. To vede k aktivaci kaspasy-9 a nakonec k apoptose.

Nutriční status buňky může být důležitým při rozhodování o osudu buňky. V oocytech obojživelníka *Xenopus laevis* bylo ukázáno, že v podmínkách dostatečné výživy, která je asociována s vysokou hladinou NADPH vytvořenou pentosafosfátovým cyklem, je prokaspasa-2 fosforylována na serinovém zbytku Ser¹³⁵ Ca²⁺/kalmmodulin-dependentní proteinkinasou II. V důsledku této fosforylace se k prokaspase-2 váže protein 14-3-3, díky čemuž je blokována asociace mezi kaspasou-2 a CRADD, čímž je poté blokována aktivace kaspasy-2 a následná apoptosa (Nutt *et al.*, 2005; Nutt *et al.*, 2009). Za podmínek nedostatečné výživy dochází k poklesu koncentrace NADPH, v důsledku čehož je prokaspasa-2 defosforylována a dochází tak k disociaci proteinu 14-3-3. Tímto mechanismem je aktivována proteasová aktivita kaspasy-2 a je spuštěna apoptosa. Bylo ukázáno, že fenotypem C2-deficientních myší je nadměrné množství vajíček, což naznačuje, že oocyty budou pravděpodobně obzvlášť citlivé na buněčnou smrt, která je zprostředkována kaspasou-2 (Bergeron *et al.*, 1998). Pro lidskou kaspasu-2 bylo bioinformatickou analýzou (Tinti *et al.*, 2014) předpověděno, že motivy kolem fosforylovaných zbytků Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ jsou 14-3-3 vazebnými motivy, nicméně tato hypotéza dosud nebyla ověřena. Ačkoliv účast proteinu 14-3-3 při inhibici kaspasy-2 byla ukázána v práci Nutt a kol., přesný mechanismus tohoto procesu pořád není zcela dobře objasněn (Nutt *et al.*, 2009).



Obr. 2.11 Struktura lidské kaspasy-2. (A) Doménová architektura lidské prokaspasy-2. CARD doména je znázorněna modře, následuje p19 doména (červeně) a p12 doména (zeleně). (B) Krystalová struktura dimeru (p19-p12)₂ lidské kaspasy-2 ve stuhové reprezentaci v komplexu s inhibitorem Ac-LDESD-cho v tyčinkové reprezentaci (PDB kód: 1PYO; Schweizer *et al.*, 2003). Domény p19 jsou znázorněny modrou barvou a domény p12 jsou znázorněny šedou barvou. Inhibitor Ac-LDESD-cho je kovalentně vázán ke katalytickému cysteinovému zbytku Cys³²⁰ (žlutá barva), který je součástí aktivního místa. Žlutou barvou jsou dále vyznačené cysteinové zbytky Cys⁴³⁶, pomocí kterých je zprostředkována dimerizace dvou protomerů kaspasy-2.

3. Cíle práce

Hlavním cílem této disertační práce bylo studium mechanismů regulace proteinkinasy ASK1 a CaMKK2 a proteasy kaspasy-2 prostřednictvím jejich vazebných partnerů, zejména proteinu 14-3-3. Důraz byl kladen na pochopení strukturní podstaty mechanismu, kterým fosforylace a vazba proteinu 14-3-3 reguluje biologickou aktivitu a funkci studovaných signálních proteinů. K dosažení tohoto cíle bylo využito metod analytické ultracentrifugace, malouhlového rozptylu světla, chemického zesíťení, měření enzymové aktivity, fluorescenční spektroskopie a nukleární magnetické rezonance.

Dílčí cíle práce:

1. Studium mechanismu, kterým protein 14-3-3 inhibuje katalytickou aktivitu proteinkinasy ASK1:
 - Provést biofyzikální a biochemickou charakterizaci komplexu katalytické domény ASK1 s proteinem 14-3-3 ζ (ASK1-KD:14-3-3 ζ).
 - Prozkoumat, zda vazba proteinu 14-3-3 ζ indukuje konformační změny v katalytické doméně proteinkinasy ASK1 a pokud ano, tak ve kterých oblastech.
 - Připravit strukturní model komplexu ASK1-KD:14-3-3 ζ s nízkým rozlišením.
2. Studium úlohy cysteinových zbytků při disociaci komplexu ASK1-TBD:TRX1:
 - Identifikovat cysteinové zbytky, které jsou klíčové pro interakci ASK1-TBD s TRX1 v redukčních podmínkách.
 - Objasnit mechanismus disociace komplexu ASK1-TBD:TRX1 při oxidaci.
3. Studium mechanismu, kterým protein 14-3-3 inhibuje katalytickou aktivitu proteinkinasy CaMKK2
 - Provést biofyzikální a biochemickou charakterizaci komplexu CaMKK2:14-3-3 γ
 - Prozkoumat, zda vazba proteinu 14-3-3 γ indukuje konformační změny v katalytické doméně proteinkinasy CaMKK2 a pokud ano, tak ve kterých oblastech.
 - Připravit strukturní model komplexu CaMKK2:14-3-3 γ s nízkým rozlišením.

4. Studium role 14-3-3 vazebných motivů pro vazbu prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3ζ
- Provést biofyzikální charakterizaci komplexu prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3ζ.
 - Prozkoumat vliv jednotlivých 14-3-3 vazebných motivů v molekule prokaspasy-2 na vazbu k proteinu 14-3-3ζ.

4. Materiál a metody

4.1 Materiál a přístroje

4.1.1 Biologický materiál

cAMP-dependentní kinasa (PKA)	Promega, USA
DNA oligonukleotidy	Generi Biotech, s.r.o., ČR
DNA polymerasa Phusion High-fidelity	New England Biolabs, Velká Británie
<i>Escherichia coli</i> , kmen BL21(DE3)	Stratagene, USA
<i>Escherichia coli</i> , kmen Rosetta(DE3)	Stratagene, USA
lysozym	SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
plasmid pET-15b	Novagen, USA
plasmid pST39	dar od dr. Evžena Bouři, ÚOCHB, AV ČR v.v.i.
plasmid prsf Duet	dar od dr. Evžena Bouři, ÚOCHB, AV ČR v.v.i.
restrikční endonukleasy	ThermoFisher Scientific, USA
standard molekulových vah Blue protein ladder	Central European Biosystems, ČR
standard molekulových vah Gene Ruler	
1 kBP DNA ladder	Fermentas, Kanada
T4 ligasa	ThermoFisher Scientific, USA

4.1.2 Chemikálie

[γ - ³² P] ATP	PerkinElmer, USA
1,4-dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Německo
2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
adenosin-5'-trifosfát (ATP)	Sigma-Aldrich, USA
agarosa GTQ	Carl Roth GmbH, Německo
akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
ampicilin	Sigma-Aldrich, USA

azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
bis-akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
barvivo pro horizontální	Carl Roth GmbH, Německo
elektroforézu Loading-Dye	New England BioLabs, USA
Bradfordovo činidlo	Sigma-Aldrich, USA
bromfenolová modř	Carl Roth GmbH, Německo
Coomassie Brilliant Blue R 250	LKB Bromma, Švédsko
dihydrát ethylendiamintetraoctanu	PENTA- Ing. Petr Švec, ČR
disodného (EDTA)	Lachema, s.r.o., ČR
dodecylsírán sodný (SDS)	Carl Roth GmbH, Německo
etanol pro UV spektroskopii	PENTA-Ing. Petr Švec, ČR
fenylmethylsufonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH, Německo
GelRed™	New England BioLabs, USA
glycerol	PENTA- Ing. Petr Švec, ČR
glycin	Carl Roth GmbH, Německo
hexahydrát síranu nikelnatého	PENTA-Ing. Petr Švec, ČR
hydroxid sodný	LACH-NER, s.r.o., ČR
chloramfenikol	Sigma-Aldrich, USA
chlorid hořečnatý	PENTA- Ing. Petr Švec, ČR
chlorid vápenatý	PENTA- Ing. Petr Švec, ČR
imidazol	Carl Roth GmbH, Německo
isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	EMD Biosciences, Inc., Německo
isopropylalkohol	Genomed, Německo
kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
kyselina boritá	LACH-NER, s.r.o., ČR
kyselina fosforečná	PENTA-Ing. Petr Švec, ČR
kyselina chlorovodíková	PENTA-Ing. Petr Švec, ČR
kyselina octová	PENTA-Ing. Petr Švec, ČR
Luria-Bertani (LB) agar	Carl Roth GmbH, Německo
Luria-Bertani (LB) médium	Carl Roth GmbH, Německo
methanol	PENTA-Ing. Petr Švec, ČR
mix deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP)	Thermo Scientific, USA
N,N,N',N'-tetraethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Německo
peroxodisírán amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA

scintilační tekutina Rotiszint™	Carl Roth GmbH, Německo
Sypro Orange (5000× koncentrované)	Sigma-Aldrich, USA
terrific broth (TB) médium	Carl Roth GmbH, Německo
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Německo

4.1.3 Ostatní materiál

dialyzační membrána, typ 27/32 (cut off 14000)	Carl Roth GmbH, Německo
filtry Spartan 13/0,45 RC	GE Healthcare, USA
koncentrátory Centricon	GE Healthcare, USA
kolona 10/50 s Q sepharosou	GE Healthcare, USA
kolona pro niklovou chelatační chromatografii	Bio-Rad Laboratories, USA
kolona Superdex 75 10/30	GE Healthcare, USA
kolona Superdex 75 Hiload 26/60	GE Healthcare, USA
kolona Superdex 75 Hiload 16/60	Amersham Biosciences, Švédsko
kolona Superdex 200 Hiload 26/60	Amersham Biosciences, Švédsko
křemenná kyveta	Agilent Technologies, Inc., USA
náplň do kolon chelatující sefarsa Fast-flow	GE Healthcare, USA
náplň do kolon Phe-sefarsa CL4B	GE Healthcare, USA
náplň do kolon Q sefarsa	GE Healthcare, USA
náplně do kolon Superdex 75, Superdex 200	GE Healthcare, USA
nylonové membránové filtry 0,45 µm	GE Healthcare, USA
P81 fosfocelulosoové papírky	Milipore, USA
sada pro izolaci DNA	ThermoFisher Scientific, USA
sada Quick Change™ Mutagenesis kit	Stratagene, USA
scintilační vialky	Kartell S.p.A, Itálie
stříkačky	CHIRANA T. Injecta, a.s., Slovenská republika

4.1.4 Přístroje

3505 pH Meter	Nova Capital Ltd., Velká Británie
analytická ultracentrifuga ProteomLab™ XL-I	Beckman Coulter, USA
automatické pipety	Eppendorf AG, Německo

centrifuga 5804R	Eppendorf, Německo
centrifuga Hermle Z323K	Hermle Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga Sigma 8K	Sigma Laborzentrifugen, Německo
femtosekundový titan-sařirový laser	Chameleon Ultra II a Pulse Picker HP, Coherent, USA
FPLC	Watrex Praha, s.r.o., Česká republika
horizontální elektroforéza	Sigma-Aldrich, USA
inkubátor	MELAG Medizintechnik, Německo
laboratorní váhy HF-200g	And, USA
LightCycler 480 II	Roche Applied Science, Německo
nanofotometr P-Class	Implen GmbH, Německo
peristaltická pumpa	IDEX Health & Science SA, Švýcarsko
Photon Counting Spectrofluorimetr PC1	ISS, Inc., USA
scintilační detektor Quantasmart™	Perkin Elmer, USA
Sonicator 3000	Misonix, Inc., USA
termoblok	Grant, UK
třepačka Gallenkamp Orbital Incubator	Gemini BV, Holandsko
třepačka Multitron	Infors AG, Švýcarsko
vertikální elektroforesa	Bio-Rad Laboratories, USA
vodní lázeň	Memmert GmbH, Německo
vortex ZX3	VELP Scientifica, Itálie
zdroj pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, USA

4.2 Exprese a purifikace proteinů

Pro přípravu mutantních variant byla použita bodová mutagenese s pomocí „Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis kit“ (Stratagene, USA). Výsledky cílené mutagenese byly ověřeny pomocí DNA sekvenování podle Sangera v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy.

Veškeré niklové chelatační chromatografie byly provedeny s Fast Flow (GE Healthcare, USA) chelatující sefárosou®. Po každé chromatografii byla zkontrolována čistota proteinu pomocí SDS-PAGE. Poté byly sloučeny frakce, změřena proteinová koncentrace a protein byl skladován při -80 °C.

4.2.1 Exprese a purifikace proteinu 14-3-3

Geny kódující lidské proteiny 14-3-3ζ a 14-3-3γ byly vloženy do plasmidu pET-15b mezi restrikční místa NdeI a BamHI jako fúzní proteiny s N-koncovou histidinovou kotvou (sekvence šesti histidinových zbytků za sebou). U isoformy 14-3-3ζ byla pro měření časově rozlišené tryptofanové fluorescenční spektroskopie připravena tzv. „noW“ varianta (tato varianta měla dva přirozené tryptofanové zbytky v sekvenci nahrazené fenylalaninovými zbytky). Dále u obou isoform byly připraveny také varianty zkrácené o C-koncový flexibilní segment, tzv. ΔC varianty: 14-3-3ζ S231stop a 14-3-3γ S235stop. Pro expresi proteinu 14-3-3 byl zvolen T7 expresní systém složený z kombinace pET-15b vektoru a bakterií *E. coli*, kmen BL21(DE3). Po indukci IPTG o koncentraci 0,5 mmol.L⁻¹ byla bakteriální kultura ponechána růst za konstantního třepání přes noc při 30 °C. Všechny varianty proteinu 14-3-3 byly dále purifikovány pomocí niklové afinitní chromatografie, aniontově výměnné chromatografie na koloně 10/50 s Q sefárosou a nakonec pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HiLoad 26/60 při průtoku 2 mL za minutu v pufru o složení 20 mM Tris (pH = 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT a 10% glycerol (w/v).

4.2.2 Exprese a purifikace katalytické domény ASK1

Gen pro celý protein ASK1 byl darem od Carrol McIntosh (University of Dundee, UK). Sekvence katalytické domény lidské ASK1 společně s 14-3-3 vazebným motivem

(659–973) byla do vektoru pST39 (Tan *et al.*, 2001) vnesena pomocí restrikčních míst XbaI a BamHI a na její C-konec byla přidána sekvence histidinové kotvy se štěpným místem pro TEV proteasu. Z důvodu nestechiometrické fosforylace 14-3-3 vazebného motivu v okolí Ser⁹⁶⁶ fosfoinositid-dependentní proteinkinasou 1 (PDK1, o které je známo, že je schopna fosforylovat 14-3-3 vazebný motiv *in vitro*, Seong *et al.*, 2010) byl 14-3-3 vazebný motiv bodovou mutagenézí upraven z RSISLP na RRISLP. Touto úpravou byl získán 14-3-3 vazebný motiv, který je možné fosforylovat komerční cAMP-dependentní proteinkinasou (PKA). Tento konstrukt je v celé práci nazýván jako ASK1-KD. Kromě tohoto konstruktu bylo připraveno několik mutantních variant: S966A (není schopna vazby na protein 14-3-3), K709M (katalyticky neaktivní), ASK1-KD W⁷⁷⁰ (mutant W865F) a ASK1-KD W⁸²³ (tato varianta měla dva přirozené tryptofanové zbytky v sekvenci nahrazené fenylalaninovými zbytky a fenylalaninový zbytek v pozici 823 měla nahrazen tryptofanovým zbytkem). Pro expresi ASK1-KD a všech jejích mutantních variant byl zvolen expresní systém bakterie *E. coli*, kmen RosettaTM (DE3) v kombinaci s vektorem pST39, který umožňuje tzv. „leakage“ expresi bez nutnosti indukce. Bakteriální kultura byla ponechána růst za konstantního třepání po dobu 20-24 hodin při 25 °C. Purifikace ASK1-KD začala niklovou afinitní chromatografií následovanou dialýzou ve 4 °C přes noc, při které proběhlo štěpení histidinové kotvy TEV proteasou (přidána v poměru 1 mg TEV na 30 mg fúzního proteinu). Úspěšnost štěpení byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE a poté následovala gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 HiLoad 26/60 při průtoku 2 mL za minutu v pufru o složení 50 mM Tris (pH = 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT a 10% glycerol (w/v).

In vitro fosforylace 14-3-3 vazebného motivu probíhala inkubací připravené ASK1-KD při 30 °C po dobu 2 hodin s komerční PKA kinasou (Promega USA, Tab. 4.1). Poté byla fosforylační reakce inkubována 12 hodin při 4 °C a nakonec bylo přidáno čerstvé ATP a PKA (množství odpovídající dosažení koncentrací v Tab. 4.1) a byla opakována inkubace při 30 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení fosforylace bylo nutné zbavit se přebytečného ATP a PKA. K tomuto účelu byla použita gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HiLoad 16/60. Výsledek fosforylace byl ověřen pomocí hmotnostní spektrometrie na MBÚ AV ČR, provedené Mgr. Petrem Manem, Ph.D.

Tabulka 4.1 Složení směsi pro *in vitro* fosforylaci ASK1-KD

Látka	Koncentrace v reakci
ASK1-KD	1 mg.mL ⁻¹
PKA	100 U/mg ASK-KD
ATP	0,75 mmol.L ⁻¹
MgCl ₂	12 mmol.L ⁻¹
Tris	50 mmol.L ⁻¹ (pH = 8)
NaCl	0,2 mol.L ⁻¹
EDTA	1 mmol.L ⁻¹
Glycerol	10% (w/v)
DTT	5 mmol.L ⁻¹

4.2.3 Exprese a purifikace proteinu MKK4

Gen kódující lidskou MKK4 (MAP2K4/SEK1) byl darem od Dustin Maly (plasmid #29579 od Adgene). Pomocí cílené mutagenese byl připraven katalyticky neaktivní mutant K131A. Fúzní protein MKK4 K131A s histidinovou kotvou byl exprimován v expresním kmenu bakterií *E.coli*, BL21(DE3). Po indukci IPTG o koncentraci 0,5 mmol.L⁻¹ byla bakteriální kultura ponechána růst za konstantního třepání přes noc při 25 °C. Fúzní protein byl dále purifikován pomocí niklové afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 HiLoad 26/60 při průtoku 2 mL za minutu v pufru o složení 20 mM Tris (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT a 10% glycerol (w/v).

4.2.4 Exprese a purifikace thioredoxin-vazebné domény ASK1

Sekvence lidské ASK1 obsahující thioredoxin vazebnou doménu (88–302) byla vložena do vektoru pST39 (Tan *et al.*, 2001) pomocí restrikčních míst XbaI a BamHI a na její C-konec byla přidána sekvence histidinové kotvy. Tento konstrukt je v celé práci nazýván jako ASK1-TBD. Kromě tohoto konstruktu bylo bodovou mutagenézí připraveno několik mutantních variant: C120S, C185S, C200S, C206S, C225S a C226S. Pro expresi ASK1-TBD a všech jejích mutantních variant byl zvolen expresní systém bakterie *E. coli*, kmen BL21 (DE3) v kombinaci s vektorem pST39 s „leakage“ expresí. Bakteriální kultura byla ponechána růst za konstantního třepání po dobu 20 hodin při 25 °C. Purifikace ASK1-TBD začala niklovou afinitní chromatografií a poté následovala gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HiLoad 26/60 při průtoku 2 mL za minutu v pufru

o složení 20 mM Tris (pH = 7,5), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT a 10% glycerol (w/v). Všechny exprese a purifikace ASK1-TBD a jejich mutantů byly prováděny Mgr. Salome Kylarovou z Laboratoře strukturní biologie signálních proteinů Akademie věd ČR.

4.2.5 Exprese a purifikace proteinu thioredoxinu 1

Expresní konstrukt kódující lidský thioredoxin 1 (TRX1 C73S) v plasmidu pQE-30 byl darem od Katja Becker (Justus-Liebig-Universität, Giessen, Německo). Mutace C73S byla provedena s cílem potlačit kovalentní dimerizaci TRX1 při vysokých koncentracích. Je známo, že tato mutace nemá dopad na katalytickou aktivitu TRX1 (Forman-Kay *et al.*, 1992; Weichsel *et al.*, 1996). Pomocí cílené mutagenese byly připraveny jeho mutantní varianty WT, C32S, C35S, C62S a C69S. Fúzní protein TRX1 s N-koncovou histidinovou kotvou byl exprimován v expresním kmenu bakterií *E.coli*, BL21(DE3). Po indukci IPTG o koncentraci 0,5 mmol.L⁻¹ byla bakteriální kultura ponechána růst za konstantního třepání přes noc při 30 °C. Fúzní protein byl dále purifikován pomocí niklové afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HiLoad 26/60 při průtoku 2 mL za minutu v pufru o složení 20 mM Tris (pH = 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT a 10% glycerol (w/v). Všechny exprese a purifikace TRX1 a jeho mutantů byly prováděny Mgr. Salome Kylarovou z Laboratoře strukturní biologie signálních proteinů Akademie věd ČR.

4.2.6 Exprese a purifikace proteinu CaMKK2

Gen kódující lidský protein CaMKK2 (93–517) byl zaklonován do vektoru pRSFDuet-1 (Novagen) mezi restrikční místa endonukleas BamHI a NotI. Upravený vektor obsahující sekvence N-koncové histidinové kotvy a GB1 domény proteinu G, které byly vloženy do prvního klonovacího místa, byl darem od Mgr. et Mgr. Evžena Bouří Ph.D. (ÚOCHB, AV ČR). Pomocí cílené mutagenese bylo připraveno několik mutantních variant. Pro strukturní studie byly připraveny varianty CaMKK2-S¹⁰⁰ (T145A, D330A, S495A a S511A) a CaMKK2-S^{100,511} (T145A, D330A a S495A), které jsou obě katalyticky neaktivní a mají vymutovaná některá PKA fosforylační místa (Obr. 2.10A), která by vzhledem k jejich nestechiometrické fosforylaci pomocí PKA vnášely do analýz nehomogenitu. CaMKK2 a všechny jeho mutanty byly exprimovány v expresním systému bakterie *E. coli*, kmen BL21(DE3). Pro růst bakterií byla využita tzv. autoindukční média

ZY (Studier, 2005), kde byla bakteriální kultura ponechána růst za konstantního třepání po dobu 5 hodin při 37°C, poté byla teplota snížena na 20 °C a kultura dále rostla přes noc. Protein byl purifikován pomocí niklové chelatační chromatografie, po které následovala dialýza ve 4°C přes noc. Na druhý den proběhla inkubace s TEV proteasou (přidána v poměru 250U TEV na 1 mg fúzního proteinu) po dobu 1 hodiny ve 30°C. Úspěšnost štěpení byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE a poté následovala gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HiLoad 26/60 při průtoku 2 mL za minutu v pufru o složení 50 mM Tris (pH = 8,0), 500 mM NaCl, 5 mM DTT a 10% glycerol (w/v).

In vitro fosforylace 14-3-3 vazebných motivů CaMKK2 v okolí aminokyselinových zbytků Ser¹⁰⁰ a Ser⁵¹¹ probíhala inkubací připravené CaMKK2 při 30 °C po dobu 3 hodin komerční PKA kinasou (Promega, USA, Tab. 4.2). Poté byla fosforylační reakce inkubována 12 hodin při 4 °C. Po ukončení fosforylace bylo nutné zbavit se přebytečného ATP a PKA. K tomuto účelu byla použita gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 75 10/30. Výsledek fosforylace byl ověřen pomocí hmotnostní spektrometrie na MBÚ AV ČR, provedené Mgr. Petrem Manem, Ph.D.

Tabulka 4.2 Složení směsi pro *in vitro* fosforylaci CaMKK2

Látka	Koncentrace v reakci
CaMKK2	0,5–5 mg.mL ⁻¹
PKA	170 U (340 U) /mg CaMKK2 ^a
ATP	0,75 mmol.L ⁻¹
MgCl ₂	20 mmol.L ⁻¹
Tris	50 mmol.L ⁻¹ (pH = 8)
NaCl	0,5 mol.L ⁻¹
Glycerol	10% (w/v)
DTT	5 mmol.L ⁻¹

^a 170 U/mg u CaMKK2-S¹⁰⁰ a 340 U/ mg u CaMKK2 WT a CaMKK2-S^{100,511}.

4.2.7 Exprese a purifikace proteinu kalmodulinu

DNA kódující potkaní kalmodulin (1–149) byla zaklonována do plasmidu pET-3a mezi restrikční místa endonukleas BamHI a NdeI. Protein byl exprimován v expresním kmenu bakterií *E.coli*, BL21(DE3). Po indukci IPTG o koncentraci 0,5 mmol.L⁻¹ byla bakteriální kultura ponechána růst za konstantního třepání přes noc při 25 °C. Protein byl dále purifikován pomocí hydrofobní interakční chromatografie za použití fenyl sefarysy CL4B (Amersham Biosciences) v přítomnosti 5mM CaCl₂. Následovala gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 75 10/30 při průtoku 0,5 mL za minutu v pufru o

složení 20 mM Tris (pH = 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM DTT a 10% glycerol (w/v).

4.2.8 Exprese a purifikace proteinu AMPKA2

Gen kódující lidskou AMPKA2 (katalytická $\alpha 2$ podjednotka AMPK) byl darem od Cheryl Arrowsmith (plasmid #36194 od Adgene). Pomocí cílené mutagenese byl připraven katalyticky neaktivní mutant K157A. Fúzní protein AMPKA2 K157A s N-koncovou histidinovou kotvou byl exprimován v expresním kmenu bakterií *E.coli*, BL21(DE3). Po indukci IPTG o koncentraci 0,5 mmol.L⁻¹ byla bakteriální kultura ponechána růst za konstantního třepání přes noc při 15 °C. Fúzní protein byl dále purifikován pomocí niklové afinitní chromatografie. Po niklové chelatační chromatografii byla zkontrolována čistota proteinu pomocí SDS-PAGE. Poté byly sloučeny frakce, změřena proteinová koncentrace a protein byl skladován při -80 °C.

4.2.9 Exprese a purifikace proteinu CaMKID

Gen kódující lidskou CaMKID byl darem od Burgess-Brown (plasmid #38834 od Adgene). Pomocí cílené mutagenese byl připraven katalyticky neaktivní mutant K165A. Fúzní protein CaMKID K165A s N-koncovou histidinovou kotvou byl exprimován v expresním kmenu bakterií *E.coli*, BL21(DE3). Po indukci IPTG o koncentraci 0,5 mmol.L⁻¹ byla bakteriální kultura ponechána růst za konstantního třepání přes noc při 15 °C. Fúzní protein byl dále purifikován pomocí niklové afinitní a gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HiLoad 26/60 při průtoku 2 mL za minutu v pufru o složení 50 mM HEPES (pH = 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM DTT a 10% glycerol (w/v).

4.2.10 Exprese a purifikace proteinu prokaspasy-2

Gen kódující lidskou kaspasu-2 (123–452) byl darem od Guy Salvesen (plasmid #11811 od Adgene) a byl překlonován do vektoru pst39 za použití SacI a KpnI restričních míst. Klonovaný úsek byl ověřen DNA sekvenováním. Fúzní protein proC2 s C-koncovou histidinovou kotvou byl exprimován v expresním kmenu bakterií *E.coli*, BL21(DE3). Po indukci IPTG o koncentraci 0,5 mmol.L⁻¹ byla bakteriální kultura ponechána růst za

konstantního třepání po dobu 1,5 hodiny při 30 °C. Fúzní protein byl dále purifikován pomocí niklové afinitní chromatografie, kationtově výměnné chromatografie na koloně Mono S 5/50 GL a nakonec pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HiLoad 26/60 při průtoku 2 mL za minutu v pufru o složení 50 mM Tris (pH = 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM DTT a 10% glycerol (w/v).

In vitro fosforylace 14-3-3 vazebných motivů proC2 probíhala inkubací připravené proC2 při 30 °C po dobu 2 hodin s komerční PKA kinasou (Promega, USA, Tab. 4.3). Poté byla fosforylační reakce inkubována 12 hodin při 4 °C. Po ukončení fosforylace bylo nutné zbavit se přebytečného ATP a PKA. K tomuto účelu byla použita gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 75 10/30. Výsledek fosforylace byl ověřen pomocí hmotnostní spektrometrie na MBÚ AV ČR, provedené Mgr. Petrem Manem, Ph.D. Všechny exprese, purifikace a fosforylace prokaspasy-2 byly prováděny Mgr. Danou Kalábovou z Laboratoře strukturní biologie signálních proteinů Akademie věd ČR.

Tabulka 4.3 Složení směsi pro *in vitro* fosforylaci proC2

Látka	Koncentrace v reakci
proC2	0,5-5 mg.mL ⁻¹
PKA	200 U /mg proC2
ATP	0,75 mmol.L ⁻¹
MgCl ₂	20 mmol.L ⁻¹
Tris	50 mmol.L ⁻¹ (pH = 8)
NaCl	0,5 mol.L ⁻¹
Glycerol	10% (w/v)
DTT	5 mmol.L ⁻¹

4.3 Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti (SV AUC)

Měření sedimentačních rychlostí bylo provedeno na analytické ultracentrifuze Proteomlab XL-I (Beckman Coulter, USA) za použití osmisektorového rotoru An-50 Ti (Beckman Coulter, USA). Hustota a viskozita pufrů a také parciální specifické objemy všech proteinů byly stanoveny pomocí programu SEDNTERP (Philo, 2006). U všech proteinů byla změřena série vzorků o různé koncentraci a v případě komplexů i vzorky za různého poměru jednotlivých komponent. Měření sedimentačních rychlostí probíhalo při 20 °C při rychlostech 48 000 nebo 42 000 ot./min v závislosti od velikosti částic. Spojité distribuce sedimentačních koeficientů (tzv. *c(s)* distribuce) byly vypočítány z naměřených sedimentačních profilů za použití programu SEDFIT (Schuck *et al.*, 2000). Hodnota

pozorovaného sedimentačního koeficientu byla získána integrací plochy pod vrcholem distribuce. Zdánlivá disociační konstanta byla odhadnuta přímým globálním modelováním Lammových rovnic s použitím reverzibilního vazebného modelu v programu SEDPHAT (Schuck *et al.*, 2003). Měřené proteiny, byly vždy den před analýzou dialyzovány do pufru bez obsahu glycerolu a DTT.

4.3.1 Sedimentační analýza komplexu ASK1-KD:14-3-3ζ

SV AUC experimenty komplexů pASK1-KD:14-3-3ζWT a pASK1-KD:14-3-3ζΔC byly provedeny při 20 °C, rychlosti 42000 ot./min a v pufru o složení 50 mM Tris (pH = 7,5), 200 mM NaCl a 2 mM 2-merkapt ethanol. Analýza směsí ASK1-KD s proteinem 14-3-3ζΔC při molárních poměrech 10:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:10 byla provedena v rozmezí koncentrací 1,8 – 180 μM pro 14-3-3ζ při konstantní 18 μM koncentraci ASK1-KD. K akvizici dat byla použita absorpční optika při 280 nm v měřící cele s optickou dráhou 1,2 cm. Vzhledem k tomu, že absorbance v měřící kyvetě byla již u poměrů 1:3 a 1:10 vyšší než 1, byly tyto dva poměry měřeny při 250 nm. V případě poměru 1:10 byla použita měřící cela s optickou dráhou 0,3 cm. Molární extinkční koeficienty pro ASK1-KD a 14-3-3ζ pro tuto vlnovou délku byly změřeny empiricky spektrofotometrem, pohybovali se přibližně na jedné třetině hodnoty molárního extinkčního koeficientu pro 280 nm. Distribuce zahrnovala rozmezí sedimentačních koeficientů 0–8 S s rozlišením 150 bodů a intervalem spolehlivosti 0,68. Všechny AUC experimenty týkající se analýzy komplexu ASK1-KD:14-3-3ζ byly prováděny pod vedením Mgr. Dalibora Koška PhD. na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy.

4.3.2 Sedimentační analýza komplexu ASK1-TBD:TRX1

SV AUC experimenty komplexů ASK1-TBD:TRX1 byly provedeny při 20 °C, rychlosti 48 000 ot./min a v pufru o složení 20 mM Tris (pH = 7,5), 200 mM NaCl a 5 mM 2-merkapt ethanol. Při analýze oxidovaných proteinů v pufru chyběl 2-merkapt ethanol. K akvizici dat byla použita interferenční optika v měřící cele s optickou dráhou 1,2 cm. K získání zdánlivé disociační konstanty bylo připraveno 5 různých koncentračních poměrů (5:3, 1:1, 1:2, 1:4, 1:10) s konstantní 5 μM koncentrací ASK1-TBD a s proměnlivými koncentracemi TRX1 v rozmezí 3–50 μM. Distribuce zahrnovala rozmezí sedimentačních koeficientů 0–4 S s rozlišením 150 bodů a intervalem spolehlivosti 0,68. První

vyhodnocení dat po získání $c(s)$ distribucí bylo provedeno metodou analýzy vazebné izotermie celkového sedimentačního koeficientu s_w získaného integrací $c(s)$ distribuce. s_w bylo vyneseno do grafu jako funkce měnící se koncentrace TRX1 a takto vynesená data byla fitována vazebným modelem, jenž předpokládal stechiometrii reverzibilní vazby 1:1. Výsledek analýzy vazebné izotermie s_w byl verifikován přímým modelováním Lammových rovnic v programu SEDPHAT.

4.3.3 Sedimentační analýza komplexu CaMKK2:14-3-3 γ

SV AUC experimenty komplexu CaMKK2:14-3-3 γ byly provedeny při 20 °C, rychlosti 42 000 ot./min a v pufru o složení 50 mM Tris (pH = 7,5), 150 mM NaCl a 1 mM TCEP. Analýza směsí CaMKK2 s proteinem 14-3-3 γ při molárních poměrech 1:20, 1:6, 1:2, 3:2, 5:1 byla provedena v rozmezí koncentrací 0,3–30 μ M pro CaMKK2 a s konstantní 6 μ M koncentrací pro 14-3-3 γ . K akvizici dat byla použita absorpční optika při 280 nm v měřící cele s optickou dráhou 1,2 cm. Vzhledem k tomu, že absorbance v měřící kyvetě byla u poměru 5:1 vyšší než 1, byla použita měřící cela s optickou dráhou 0,3 cm. Distribuce zahrnovala rozmezí sedimentačních koeficientů 0–8 S s rozlišením 150 bodů a intervalem spolehlivosti 0,68.

4.3.4 Sedimentační analýza komplexu proC2:14-3-3 ζ

SV AUC experimenty komplexu proC2:14-3-3 ζ byly provedeny při 20 °C, rychlosti 42 000 ot./min a v pufru o složení 20 mM Tris (pH = 7,5), 150 mM NaCl a 1 mM TCEP. Analýza směsí proC2 s proteinem 14-3-3 ζ při molárních poměrech 5:1, 3:2, 1:2, 1:6 a 1:20 byla provedena v rozmezí koncentrací 0,6–70 μ M pro 14-3-3 ζ a s konstantní 3,5 μ M koncentrací pro proC2. K akvizici dat byla použita absorpční optika při 280 nm v měřící cele s optickou dráhou 1,2 cm. Vzhledem k tomu, že absorbance v měřící kyvetě byla u poměru 1:20 vyšší než 1, byla použita měřící cela s optickou dráhou 0,3 cm. Distribuce zahrnovala rozmezí sedimentačních koeficientů 0–8 S s rozlišením 150 bodů a intervalem spolehlivosti 0,68.

4.4 ^{32}P stanovení katalytické aktivity

4.4.1 Stanovení katalytické aktivity ASK1-KD

Pro stanovení katalytické aktivity připravené katalytické domény ASK1 bylo použito značené $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP a rekombinantní lidská MKK4 K131A (katalyticky neaktivní fyziologický substrát ASK1). Složení reakční směsi o objemu 45 μL je uvedeno v Tab. 4.4. Reakce byla provedena při 30 °C a byla odstartována přidavkem 5 μL 2,5 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (PerkinElmer, USA; 250 μM ATP v reakci). Toto množství ATP v reakční směsi přibližně odpovídalo radioaktivitě 2,5 μCi na reakci. Inkubace trvala 2,5 hodiny a byla ukončena pipetováním 40 μL reakční směsi na P81 fosfocelulosoový papírek (Milipore), který byl poté ponořen do 75 mM kyseliny fosforečné a inkubován 5 minut. Tato 5minutová inkubace byla dvakrát opakována s použitím čerstvé lázně 75 mM kyseliny fosforečné. Poté byly papírky vysušeny a ponořeny do 5 mL scintilační tekutiny. Aktivita byla měřena scintilačním detektorem (QuasmatTM, PerkinElmer, USA).

Tab. 4.4 Typické složení kinasové reakce

Látka	Koncentrace v reakci
ASK1-KD WT (ASK1-KD S966A)	200 nmol.L ⁻¹
MKK4 K131A	2,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$	70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Tris (pH 7,5)	50 mmol.L ⁻¹
NaCl	150 mmol.L ⁻¹
MgCl ₂	20 mmol.L ⁻¹
DTT	5 mmol.L ⁻¹

4.4.2 Stanovení katalytické aktivity CaMKK2

Pro stanovení katalytické aktivity připravené proteinkinasy CaMKK2 bylo použito značené $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP a rekombinantní lidská AMPKA2 D157A nebo rekombinační lidská CaMKID D165A (katalyticky neaktivní fyziologické substráty CaMKK2). Složení reakční směsi o objemu 45 μL je uvedeno v Tab. 4.5. Reakce byla provedena při 30 °C a byla odstartována přidavkem 5 μL 1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (PerkinElmer, USA; 100 μM ATP v reakci). Toto množství ATP v reakční směsi přibližně odpovídalo radioaktivitě 2,5 μCi na reakci. Inkubace trvala 5 minut a byla ukončena pipetováním 40 μL reakční směsi na P81 fosfocelulosoový papírek (Milipore), který byl poté ponořen do 75 mM kyseliny fosforečné a inkubován 5 minut. Tato 5minutová inkubace byla dvakrát opakována s použitím čerstvé

lázň 75 mM kyseliny fosforečné. Poté byly papírky vysušeny a ponořeny do 5 mL scintilační tekutiny. Aktivita byla měřena scintilačním detektorem (QuantsmartTM, PerkinElmer, USA).

Tab. 4.5 Typické složení kinasové reakce

Látka	Koncentrace v reakci
CaMKK2	10 nmol.L ⁻¹
CaMKID K131A nebo AMPKA2 D157A	10 μmol.L ⁻¹
14-3-3γ	100 μmol.L ⁻¹
Kalmodulin	5 μmol.L ⁻¹
HEPES (pH 7,5)	50 mmol.L ⁻¹
NaCl	200 mmol.L ⁻¹
CaCl ₂	1 mmol.L ⁻¹
MgCl ₂	20 mmol.L ⁻¹
DTT	1 mmol.L ⁻¹
Glycerol	10 % (w/w)

4.5 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Veškerá SAXS data v této práci byla měřena na synchrotronu DESY v Hamburgu (Německo), na okruhu PETRA III v rámci Evropské laboratoře pro molekulární biologii. Zpracování dat a strukturní modelování bylo provedeno školitelem.

4.5.1 SAXS analýza komplexu pASK1-KD:14-3-3ζΔC

Složení pufru, ve kterém probíhala SAXS měření, bylo 50 mM Tris (pH = 7,5), 200 mM NaCl a 1 mM EDTA a 2 mM DTT. Rozsah koncentrací pro ASK1-KD byl 4,1–9,1 mg.mL⁻¹, pro 14-3-3ζΔC 7,7–17,4 mg.mL⁻¹ a pro komplex pASK1-KD:14-3-3ζΔC (s molární stechiometrií 2:2) byl 7,7–17,6 mg.mL⁻¹. Počáteční intenzita rozptylu $I(0)$ a gyrační poloměr R_g byly vypočítány pomocí Guinierovy aproximace pro rozptylový vektor s ($s=4\pi\sin(\theta)/\lambda$, kde 2θ je úhel mezi dopadajícím a rozptýleným paprskem a λ je vlnová délka) v rozmezí, které splňuje podmínku $sR_g < 1,3$ (Guinier, 1939). Distribuční funkce meziatomových vzdáleností $P(r)$ a maximální intramolekulární vzdálenosti D_{\max} byly vypočítány pomocí programu GNOM (Svergun, 1992). Zdánlivé relativní molekulové hmotnosti (MM_{\exp}) byly odhadnuty na základě srovnání $I(0)$ s referenčním hovězím sérovým albuminem. Porodův objem, V_P byl vypočítán pomocí programu PRIMUS (Konarev *et al.*, 2003). Pro výpočet *ab initio* molekulových obálek byl použit program DAMMIF (Franke *et al.*, 2009). Více DAMMIF iterací bylo zprůměrováno pomocí

programu DAMAVER (Volkov *et al.*, 2003). Program SUPCOMB (Kozin *et al.*, 2001) byl použit ke vložení a natočení krystalových struktur do vypočtených molekulových obálek. Programy CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995) a FoXS (Schneidan-Duhovny *et al.*, 2013) byly pak použity k výpočtu teoretických rozptylových křivek strukturních modelů a k jejich fitování experimentálními SAXS daty.

4.5.2 SAXS analýza komplexu pCaMKK2:14-3-3 γ

Složení pufru, ve kterém probíhala SAXS měření, bylo 50 mM Tris (pH = 7,5), 150 mM NaCl a 1 mM CaCl₂, 3% glycerol (w/v) a 1 mM TCEP. Rozsah koncentrací pro pCaMKK2 byl 1–2,8 mg.mL⁻¹ a pro 14-3-3 γ ΔC 1,5–3 mg.mL⁻¹ a pro komplex pCaMKK2:14-3-3 γ ΔC (s molární stechiometrií 1:2) byl 9,9–16,9 mg.mL⁻¹. Počáteční intenzita rozptylu $I(0)$ a gyrační poloměr R_g byly vypočítány pomocí Guinierovy aproximace pro rozptylový vektor s v rozmezí, které splňuje podmínku $sR_g < 1,3$ (Guinier, 1939). Distribuční funkce meziatomových vzdáleností $P(r)$ a maximální intramolekulární vzdálenosti D_{\max} byly vypočítány pomocí programu GNOM (Svergun, 1992). Zdánlivé relativní molekulové hmotnosti (MM_{exp}) byly odhadnuty na základě srovnání $I(0)$ jak s referenčním hovějším sérovým albuminem, tak s vyloučeným objemem hydratované částice (Porodův objem, V_P ; Petoukhov *et al.*, 2012). V_P bylo vypočítáno pomocí programu PRIMUS (Konarev *et al.*, 2003). *Ab initio* molekulární obálky byly vypočteny v programu DAMMIF (Franke *et al.*, 2009). Dvacet nezávislých iterací bylo zprůměrováno do jedné reprezentativní struktury pomocí softwaru DAMAVER. Programem MONSA (Svergun, 1999) bylo provedeno multifázové modelování komplexu pCaMKK2-S¹⁰⁰:14-3-3 γ ΔC. Programem CORAL (Petoukhov *et al.*, 2012) bylo provedeno modelování „rigid body“ komplexu pCaMKK2-S¹⁰⁰:14-3-3 γ ΔC. Tento program modeluje flexibilní úseky chybějící v krystalové struktuře jako řetěz sfér o velikosti odpovídající průměrné aminokyselině (tzv. „dummy“ aminokyselinové zbytky). Jako rigidní domény byly použity krystalové struktury dimeru 14-3-3 γ (PDB kód 2B05) a katalytická doména CaMKK2 (PDB kód 5UY6). Program EOM (Bernado *et al.*, 2007) byl použit k analýze založené na celkové optimalizační metodě.

4.6 ^{31}P nukleární magnetická rezonance (^{31}P NMR)

^{31}P NMR spektra s protonovým dekaplinkem byly změřeny na přístroji Bruker AVANCE III (^1H při 500.00 MHz a ^{31}P při 202,4 MHz; ÚOCHB, AV ČR), součástí kterého je také kryosonda 5 mm BBO CryoProbe. Jako standard ^{31}P chemických posunů byla použita 85% (w/w) kyselina fosforečná. Typicky bylo akumulováno 10 000 skenů se spektrální šířkou 400 ppm a s akvizičním časem 0,4 s, který dal vzniknout 64 000 bodům. Opakovací prodleva dlouhá 2 s vedla k celkové době měření 6 hodin na jedno spektrum. Ve zpracování bylo aplikováno Lorenzovo rozšíření o 20 Hz. Experimentální teplota byla 23 °C. Protein ASK1-KD (ASK1-KD S966A) byl měřen při 100–200 μM koncentraci a protein 14-3-3 ζ ΔC byl měřen při 500–900 μM koncentraci v pufru o složení 50 mM Tris (pH = 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% (w/v) glycerol a 10% (v/v) D_2O . Výsledný poměr signál/šum byl v rozmezí 20–80. Všechny NMR experimenty a zpracování dat bylo provedeno pod vedením RNDr. Martina Dračínského PhD. na ÚOCHB, AV ČR.

4.7 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Veškeré experimenty časově rozlišeného dohasínání intensity a anizotropie fluorescence byly měřeny metodou časově korelovaného počítání fotonů. Fluorimetr, který byl k tomuto účelu použit se skládal z femtosekundového titan-sařirového laseru (model Chameleon Ultra II a Pulse Picker HP), detektoru založeného na počítání jednotlivých fotonů (single photon counting detector) a fotonásobiče (Hamamatsu, R3809U-50). Pro excitaci tryptofanové fluorescence byla zvolena vlnová délka 298 nm a tryptofanová fluorescence byla detekována při 335 nm za použití kombinace monochromátoru se skleněnými filtry UG1 a BG40 (Thorlabs) umístěnými před vstupní štěrbínou. Vzorky byly umístěny do termostatického držáku a všechna měření byla provedena při teplotě 23 °C v pufru o složení 50 mM Tris (pH = 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% glycerol (w/v) a 0,05% (w/v) NP-40. Koncentrace mutantů pASK1-KD byla 15 μM a koncentrace 14-3-3 ζ noW byla 110 μM . Veškerá měření časově rozlišené fluorescence byla provedena pod vedením doc. RNDr. Petra Heřmana, CSc. a doc. RNDr. Jaroslava Večeře, CSc. z Fyzikálního Ústavu Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy a veškeré rovnice v následujícím textu byly převzaty z literatury (Lakowicz, 2006).

4.7.1 Časově rozlišené měření dohasínání intenzity fluorescence

Dohasínání fluorescence bylo považováno za multiexponenciální dle rovnice (1)

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{(-t/\tau_i)} \quad (\text{Rovnice 1})$$

ve které τ_i jsou doby života excitovaných stavů a α_i jsou příslušné amplitudy. Emisní dohasínání $I(t)$ bylo analyzováno metodou maximální entropie (Vecer *et al.*, 2011). Použitý program generuje sady amplitud α_i , jež reprezentují distribuci dob života excitovaného stavu. Střední doba života excitovaného stavu byla vypočítána dle rovnice (2)

$$\tau_{mean} = \sum_i f_i \cdot \tau_i = \sum_i (\alpha_i \tau_i^2) / \sum_i (\alpha_i \tau_i) \quad (\text{Rovnice 2})$$

ve které jsou f_i frakční intenzity komponent příslušných dob života excitovaného stavu.

Dohasínání intenzity fluorescence $I(t)$ bylo měřeno pod „magickým“ úhlem, při kterém měřené hodnoty intenzity dohasínání fluorescence $I(t)$ nezávisí na rotační difúzi fluoroforu.

4.7.2 Časově rozlišené měření dohasínání anizotropie fluorescence

Dohasínání anizotropie fluorescence $r(t)$ bylo získáno současným časově rozlišeným měřením rovnoběžných $I_{||}(t)$ a kolmých $I_{\perp}(t)$ složek intenzity fluorescence. K vyhodnocení dat byla použita metoda maximální entropie (Vecer *et al.*, 2011). Anizotropie fluorescence $r(t)$ byla analyzována pro sadu exponenciál podle rovnice (3)

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{(-t/\Phi_i)} \quad (\text{Rovnice 3})$$

ve které amplitudy β_i reprezentují distribuci rotačně-korelačních časů Φ_i a závisí na počáteční anizotropii r_0 podle rovnice (4)

$$\sum_i \beta_i = r_0 \quad (\text{Rovnice 4})$$

Typicky bylo použito 100 rotačně-korelačních časů rovnoměrně rozmístěných na logaritmické škále od 100 ps do 200 ns.

4.8 Diferenční skenovací fluorimetrie (DSF)

K provedení diferenční skenovací fluorimetrie byl použit přístroj LightCycler 480 II cycler (Roche Applied Science, Německo). Roztoky proteinů o koncentraci $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ byly testovány v přítomnosti $8\times$ koncentrovaného barviva Sypro Orange (Sigma-Aldrich, USA) o celkovém objemu $25 \text{ }\mu\text{l}$ v 96 jamkové mikrotitrační destičce. Destička byla přelepena fólií pro zabránění vypařování vzorků v průběhu experimentu. V metodě byl nastaven teplotní gradient $20\text{--}95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ s rychlostí $0,01^{\circ}\text{C/s}$. Vlnová délka excitace fluorescence byla nastavena na 465 nm a emisní vlnová délka činila 580 nm . Pomocí softwaru Roche LightCycler 480 SW 1.5 (Niesen *et al.*, 2007) byly vyhodnoceny hodnoty denaturačních teplot T_D odpovídajících inflexním bodům denaturačních křivek a byly určeny jako minima prvních záporných derivací těchto křivek.

5. Výsledky a diskuse

V následujících kapitolách jsou diskutovány zejména ty experimenty, na nichž jsem se osobně podílela. Ostatní výsledky jsou součástí publikovaných prací, které jsou uvedeny v příloze disertační práce.

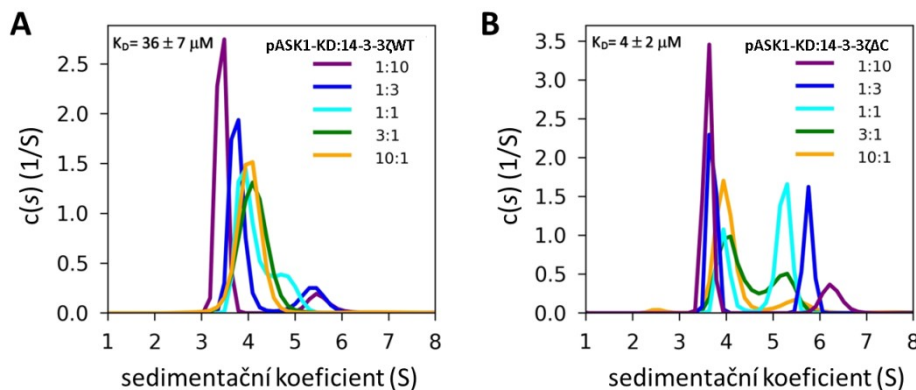
5.1 Vliv vazby proteinu 14-3-3 na strukturu a funkci katalytické domény proteinkinasy ASK1 (publikace I)

ASK1 je členem MAP3K rodiny a podílí se na regulaci mnoha fyziologických procesů (Shiizaki *et al.*, 2013). K její aktivaci dochází při různých stresových podnětech a její zvýšená aktivita je spojována s progresí různých nemocí, jako jsou například rakovina, neurodegenerativní onemocnění, zánět a cukrovka (Kawarazaki *et al.*, 2014). ASK1 je za klidových, nestresových podmínek součástí komplexu o vysoké molekulové hmotnosti, takzvaného ASK1 signalosomu, ve kterém je aktivita ASK1 inhibována prostřednictvím interakce s několika proteiny, včetně proteinu 14-3-3 (Noguchi *et al.*, 2005; Cockrell *et al.*, 2010). Protein 14-3-3 je k ASK1 navázán pomocí fosforylovaného motivu v okolí Ser⁹⁶⁶, který se v sekvenci nachází za katalytickou doménou (Zhang *et al.*, 1999; Goldman *et al.*, 2004). Nicméně molekulární mechanismus, kterým protein 14-3-3 inhibuje ASK1 doposud nebyl objasněn. V této práci byla zkoumána struktura komplexu mezi katalytickou doménou ASK1 fosforylovanou na Ser⁹⁶⁶, proteinem 14-3-3 ζ a vzájemné interakce těchto dvou proteinů.

5.1.1 ASK1-KD a protein 14-3-3 ζ vytvářejí stabilní komplex se stechiometrií 2:2

Prvním krokem v charakterizaci interakce mezi katalytickou doménou ASK1 fosforylovanou na Ser⁹⁶⁶ (pASK1-KD) a proteinem 14-3-3 ζ byla analytická ultracentrifugace, metoda sedimentační rychlosti (SV AUC). Série normalizovaných spojitých distribucí sedimentačních koeficientů (tzv. $c(s)$ distribuce) byly vypočítány na základě měření sedimentační rychlosti částic ve vzorcích komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ o pěti různých molárních poměrech (1:10, 1:3, 1:1, 3:1 a 10:1, Obr. 5.1A). Koncentrace pASK1-KD byla v každé z $c(s)$ distribucí konstantní (18 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) a koncentrace 14-3-3 ζ se pohybovaly v rozsahu 1,8–180 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Přímým globálním modelováním Lammových rovnic v programu SEDPHAT byla odhadnuta hodnota zdánlivé disociační konstanty K_d

komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ na $36 (\pm 7) \mu\text{M}$ za použití reverzibilního vazebného modelu, ve kterém jeden dimer pASK1-KD interaguje s jedním dimerem 14-3-3 ζ WT a oba proteiny byly považovány za pevné nedisociující dimery.



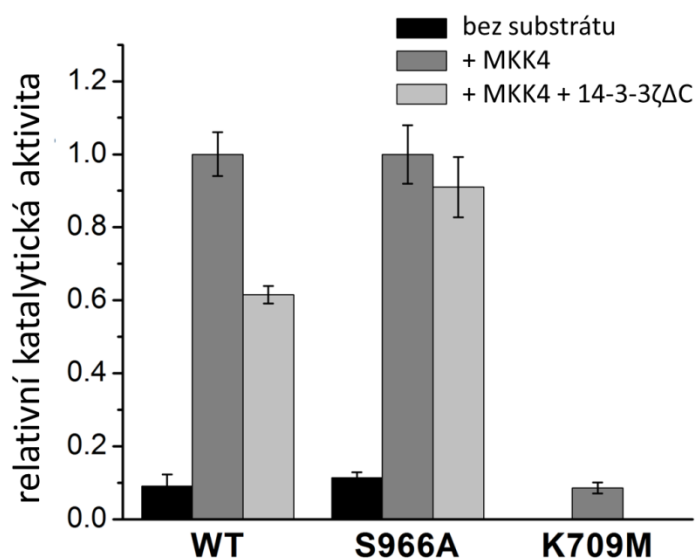
Obr. 5.1 Porovnání sedimentačních analýz pro komplexy pASK1-KD:14-3-3 ζ WT a pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC. (A) Série normalizovaných spojitých distribucí sedimentačních koeficientů komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ WT. Následnou globální analýzou v programu SEDPHAT (Schuck, 2003) byla odhadnuta zdánlivá disociační konstanta na hodnotu $36 \pm 7 \mu\text{M}$. (B) Série normalizovaných spojitých distribucí sedimentačních koeficientů komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC. Následnou globální analýzou v programu SEDPHAT byla odhadnuta zdánlivá disociační konstanta na hodnotu $4 \pm 2 \mu\text{M}$. pASK1-KD má v každé z $c(s)$ distribucí koncentraci $18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a koncentrace 14-3-3 ζ (WT a ΔC) se pohybovaly v rozsahu $1,8\text{--}180 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Metoda výnosu sedimentačních vazebných izoterem, zde nemohla být použita, neboť data byla kombinována z experimentů při různých vlnových délkách a optických drahách (viz kap. 4.3.1) a modely, které se pro ně používají, neumožňují v programu SEDPHAT nastavení takového množství rozdílných parametrů mezi experimenty. Ke zvýšení stability komplexu pro strukturní studie byl navrhnut konstrukt proteinu 14-3-3 ζ zkrácený o C-koncový segment, 14-3-3 ζ S231stop (14-3-3 ζ ΔC), který může vázat ligandy s výrazně vyšší afinitou (Ottmann *et al.*, 2007; Kacirova *et al.*, 2015). SV AUC měření a následná globální analýza s proteinem 14-3-3 ζ ΔC (Obr. 5.1B) ukázaly, že hodnota K_d klesla na $4 (\pm 2) \mu\text{M}$. Z tohoto důvodu byly všechny další experimenty v této publikaci prováděny s konstruktem 14-3-3 ζ ΔC. Pozorovaná hodnota sedimentačního koeficientu (při standardním stavu vody a teplotě 20°C), $s_{(20,w)}$, pro studovaný komplex činila $6,2 \text{ S}$ (na základě $c(s)$ distribuce směsi s nejvyšším molárním poměrem 14-3-3 ζ ΔC k ASK1-KD, fialová křivka na Obr. 5.1B), která v kombinaci s hodnotou frikčního poměru f/f_0 odpovídá relativní molekulové hmotnosti přibližně $121\,000$, což nejlépe odpovídá molární

stechiometrii 2:2 (dimer katalytické domény ASK1 interagující s dimerem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, teoretická relativní molekulová hmotnost takového komplexu činí 128 000).

5.1.2 Vazba proteinu 14-3-3 inhibuje katalytickou aktivitu ASK1-KD

Připravená katalytická doména ASK1 byla katalyticky aktivní, čehož bylo využito při zkoumání vlivu proteinu 14-3-3 ζ na katalytickou aktivitu katalytické domény ASK1. Ke stanovení katalytické aktivity ASK1-KD byla použita metoda měření radioaktivity β zářiče ^{32}P . Tato metoda je založena na kvantifikaci přenosu radioaktivně značeného ^{32}P fosfátu z molekuly ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$) na molekulu substrátu. Jako substrát byla použita lidská mitogenem-aktivovaná proteinkinasa 4 (MKK4), která je fyziologickým substrátem ASK1. Analýza ukázala, že přidavek 14-3-3 $\zeta\Delta$ C do reakční směsi snížil aktivitu pASK1-KD o 40%, přičemž v případě mutantu pASK1-KD S966A, který neváže protein 14-3-3, nebyl pozorován signifikantní inhibiční efekt (Obr. 5.2).

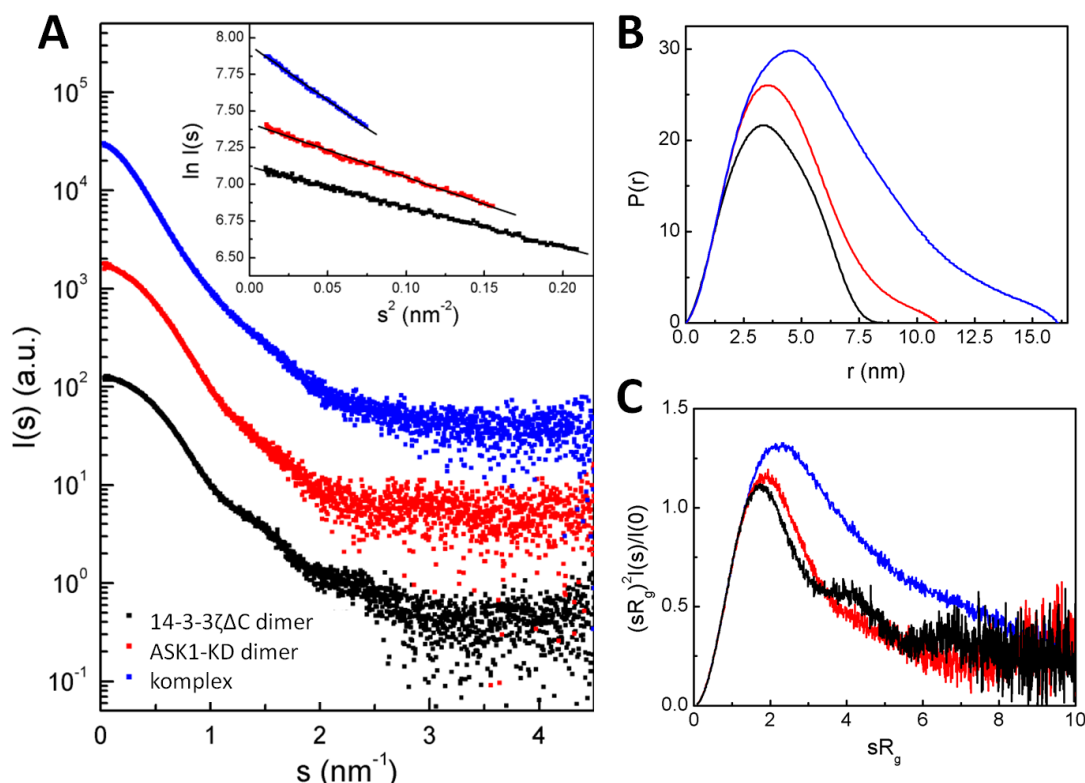


Obr. 5.2. Katalytická aktivita pASK1-KD WT a pASK1-KD S966A v přítomnosti a v nepřítomnosti proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Aktivita v přítomnosti proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C byly normalizovány na aktivity v nepřítomnosti 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Aktivita katalyticky neaktivního mutantu pASK1-KD K709M byla normalizována podle aktivity pASK1-KD WT. Jako substrát byla použita lidská MKK4 (jeho katalyticky neaktivní mutant K131A). Každý vzorek byl změřen 4 \times a výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka. Specifická aktivita pASK1-KD WT v nepřítomnosti 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (100% aktivity) byla stanovena na hodnotu 1,29 (\pm 0,08) nmol substrátu za minutu na mg enzymu.

Tato inhibice je konzistentní s výsledky prací Zhang a kol. a Goldman a kol. (Zhang *et al.*, 1999; Goldman *et al.*, 2004), které ukázaly, že vazba proteinu 14-3-3 na ASK1 výrazně potlačila apoptosu v důsledku inhibice katalytické aktivity ASK1 proteinem 14-3-3.

5.1.3 Komplex pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC je v roztoku konformačně heterogenní

SAXS měření byla použita ke strukturní charakterizaci komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC s nízkým rozlišením. Byly změřeny rozptylové křivky pro 14-3-3 ζ ΔC, ASK1-KD a komplex pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC při různých koncentracích (připraven smícháním jednotlivých komponent v poměru 1:1; Obr. 5.3A).



Obr. 5.3 Experimentální SAXS data a SAXS analýza ASK1-KD, 14-3-3 ζ ΔC a jejich komplexu. (A) Intenzita rozptylu jako funkce rozptylového vektoru s ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, viz kap. 4.5). Černou barvou jsou vynesena data pro samotný protein 14-3-3 ζ ΔC, červeně jsou vyznačena data pro samotnou ASK1-KD a data pro komplex pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC jsou znázorněny barvou modrou. Pro lepší přehlednost jsou experimentální hodnoty bodů rozptylových křivek pro 14-3-3 ζ ΔC posunuty o konstantní faktor 10^{-1} a pro komplex o konstantní faktor 10^1 ve směru osy y. V pravém horním rohu jsou ukázány Guinierovy výnosy ($\ln I(s)$ proti s^2) pro jednotlivé rozptylové křivky v odpovídajících barvách. (B) Distribuce meziatomových vzdáleností $P(r)$ pro 14-3-3 ζ ΔC, ASK1-KD a komplex v odpovídajících barvách vypočítané z rozptylových křivek pomocí programu GNOM (Svergun, 1992). (C) Normalizované Kratkeho výnosy pro 14-3-3 ζ ΔC, ASK1-KD a komplex v odpovídajících barvách.

Komplex byl připraven o koncentracích 60, 95 a 137 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, tedy dostatečně nad hodnotou zdánlivé disociační konstanty ($K_d \sim 4 \mu\text{M}$, viz kap. 5.1.1). Guinierův výnos, koncentrační závislost počáteční intenzity rozptylu $I(0)$, Porodova objemu V_P a gyračního poloměru R_g byly použity pro vyhodnocení kvality primárních dat (Tab. 5.1). Guinierovy výnosy byly dostatečně lineární pro všechny vzorky kromě vzorku s nejvyšší koncentrací komplexu. Nelinearita Guinierova výnosu indikuje přítomnost agregátů ve vzorku (Guinier, 1993). Koncentrační závislosti R_g a $I(0)$ naznačily přítomnost odpudivých intermolekulárních interakcí ve vzorcích 14-3-3 ζ AC a přitažlivých intermolekulárních interakcí ve vzorcích ASK1-KD a komplexu s nejvyšší koncentrací. Proto byly pro *ab initio* rekonstrukce molekulárního tvaru a strukturní modelování použita data získaná pro vzorky s koncentracemi uvedenými v Tabulce 5.1.

Tabulka 5.1: Strukturní parametry ASK1-KD a 14-3-3 ζ AC určené ze SAXS

Vzorek	c (mg.mL ⁻¹)	c^a ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	R_g^b (Å)	R_g^c (Å)	D_{max}^d (Å)	$M_{I(0)}^{e,f}$ (kDa)	V_P^g (nm ³)
dimer ASK1-KD	6,3	87	32,7 \pm 0,1	33,1 \pm 0,1	109	68,2 \pm 0,2	121
dimer 14-3-3 ζ AC	7,7	136	28,8 \pm 0,1	28,6 \pm 0,1	85	51,0 \pm 0,2	87
komplex (2:2)	12,2	94,6	47,7 \pm 0,2	48,1 \pm 0,1	161	117,4 \pm 0,4	236

^a Molární koncentrace dimerů ASK1-KD, 14-3-3 ζ AC a jejich komplexu s molární stechiometrií 2:2.

^b Určeno Guinierovou aproximací (Guinier., 1939).

^c Určeno z $P(r)$ funkce pomocí programu GNOM (Svergun, 1992).

^d Určeno nepřímou Fourierovou transformací z experimentálních dat.

^e Určeno srovnáním počáteční intenzity rozptylu $I(0)$ s referenčním hovězím sérovým albuminem.

^f Teoretické molekulové hmotnosti pro ASK1-KD, 14-3-3 ζ AC a jejich komplex jsou 72,2; 56,6 a 128,9 kDa

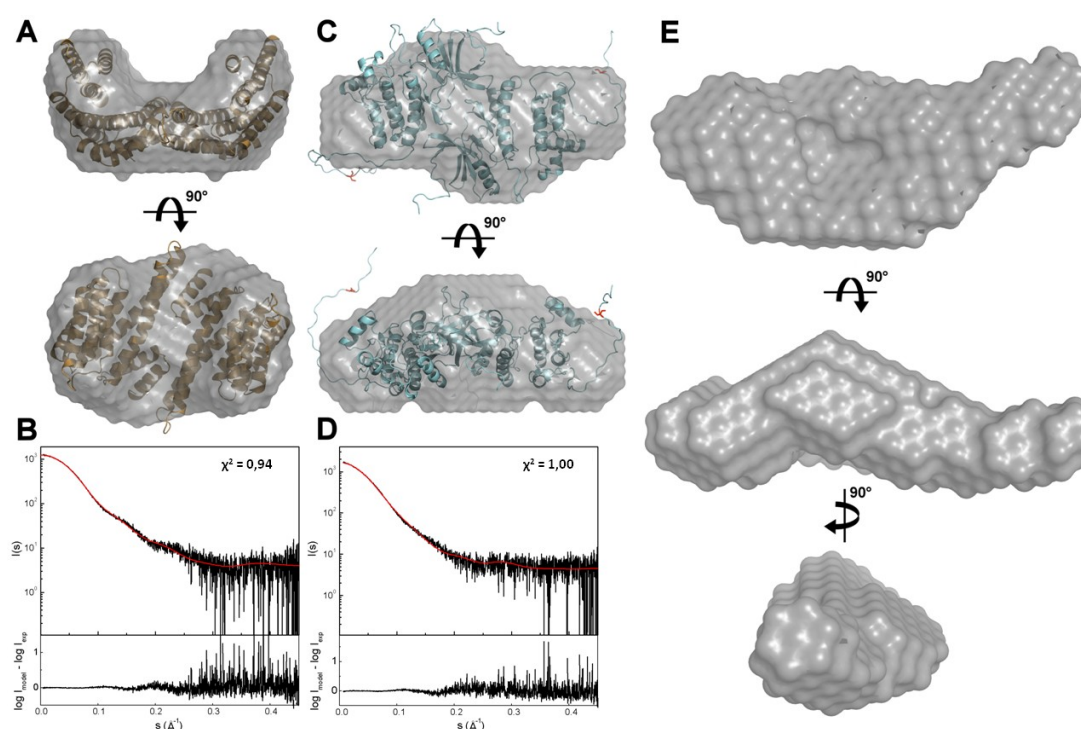
^g Porodův objem – vyloučený objem hydratované částice.

Zdánlivé relativní molekulové hmotnosti 68 200 pro ASK1-KD a 51 000 pro 14-3-3 ζ AC odhadnuty porovnáním $I(0)$ s hodnotou pro referenční hovězí sérový albumin jsou v dobré shodě s teoretickými hodnotami relativních molekulových hmotností pro dimery těchto proteinů (Tab. 5.1). Odhadovaná relativní molekulová hmotnost 117 400 pro komplex stejně jako Porodův objem $V_P = 236 \text{ nm}^3$ dobře odpovídá molární stechiometrii 2:2 ($M_{\text{teor}} = 128\,900$), což potvrzuje výsledky z SV AUC. Pro globulární proteiny by se hodnota V_P měla pohybovat kolem 1,7 násobku molekulové hmotnosti v kDa (Petoukhov *et al.*, 2012).

Porovnání distribučních křivek meziatomových vzdáleností $P(r)$ ukázalo, že $P(r)$ komplexu vykazuje větší zastoupení delších intramolekulárních vzdáleností a výrazně vyšší hodnotu maximální intramolekulární vzdálenosti D_{max} . To naznačuje, že v porovnání s dimery proteinů 14-3-3 ζ AC a ASK1-KD má jejich komplex protáhlejší tvar (Obr. 5.3B a

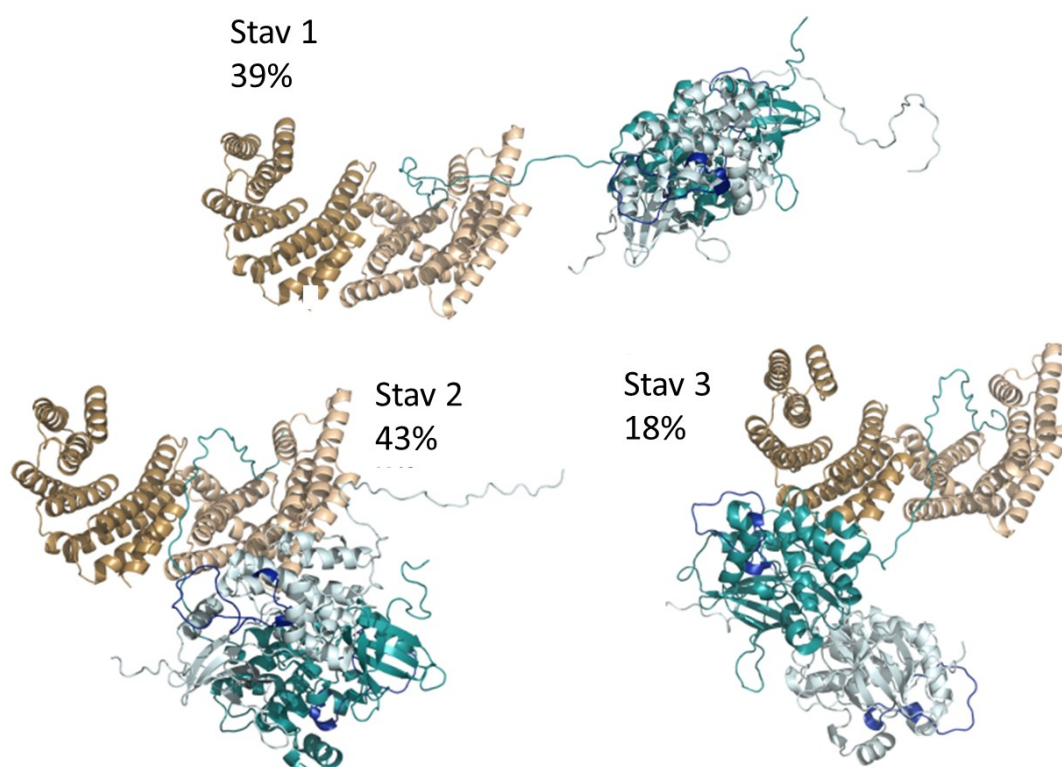
Tab 5.1). Normalizované Kratkeho výnosy pro 14-3-3 ζ ΔC a ASK1-KD jsou křivkami zvonovitého tvaru s maximální hodnotou $sR_g = 1,7$; což je typické pro kompaktní molekuly (Obr. 5.3C; Receveur-Brechot *et al.*, 2012). Na stranu druhou, normalizovaný Kratkeho výnos pro komplex naznačuje vyšší flexibilitu molekuly komplexu, což je vidět z pozvolnějšiho poklesu funkce směrem k nule u vyšších hodnot sR_g s maximem v bodě $sR_g \sim 2,2$.

Superpozice *ab initio* molekulové obálky dimeru 14-3-3 ζ ΔC s jeho krystalovou strukturou (PDB kód: 1QJA; Rittinger *et al.*, 1999) odhalila správnou reprodukci tvaru molekuly (Obr. 5.4A).



Obr. 5.4 *Ab initio* rekonstrukce tvaru částic vypočítané na základě experimentálních SAXS dat. (A) *Ab initio* rekonstrukce proteinu 14-3-3 ζ ΔC (znázorněno šedou obálkou) se superponovanou krystalovou strukturou (PDB kód: 1QJA; Rittinger *et al.*, 1999). (B) Porovnání teoretické rozptylové křivky krystalové struktury 14-3-3 ζ ΔC (červená křivka) s experimentálními daty (černá křivka). (C) *Ab initio* rekonstrukce ASK1-KD (znázorněno šedou obálkou) se superponovaným AllosMod modelem ASK1-KD (659–973; PDB kód: 2CLQ; Bunkoczi *et al.*, 2007). (D) Porovnání teoretické rozptylové křivky AllosMod modelu ASK1-KD (červená křivka) s experimentálními daty (černá křivka). (E) *Ab initio* rekonstrukce komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC (znázorněno šedou obálkou). Všechny *ab initio* rekonstrukce molekulového tvaru byly provedeny použitím programu DAMMIF (Franke *et al.*, 2009). Vypočítané molekulové obálky byly srovnány s krystalovou strukturou nebo strukturním modelem pomocí programu SUPCOMB (Kozin *et al.*, 2001). Teoretické rozptylové křivky byly vypočítány z krystalové struktury nebo strukturního modelu a srovnány s experimentálními daty použitím programu CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995).

Teoretická rozptylová křivka vypočítaná z krystalové struktury je v dobré shodě s experimentálními daty (Obr. 5.4B; $\chi^2 = 0,94$; $R_g = 29,2$ Å). Superpozice *ab initio* molekulové obálky ASK1-KD s AllosMoD modelem ASK1-KD (659–973) také ukázala správnou reprodukci tvaru molekuly (Obr. 5.4C) a je také v dobré shodě s experimentálními SAXS daty (Obr. 5.4D; $\chi^2 = 1,00$; $R_g = 33,3$ Å). Tento model byl připraven z krystalové struktury ASK1-KD (PDB kód: 2CLQ; Bunkoczi *et al.*, 2007) pomocí metody AllosMod-FoXS (Weinkam *et al.*, 2012; Schneidman-Duhovny *et al.*, 2010). Molekulová obálka komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC je, podle očekávání, mnohem větší ve srovnání se samotnými ASK1-KD a 14-3-3 ζ ΔC. Jedna strana je širší než strana druhá, což nejspíš znamená, že jednotliví vazební partneři budou v komplexu uspořádání asymetricky (Obr. 5.4E).



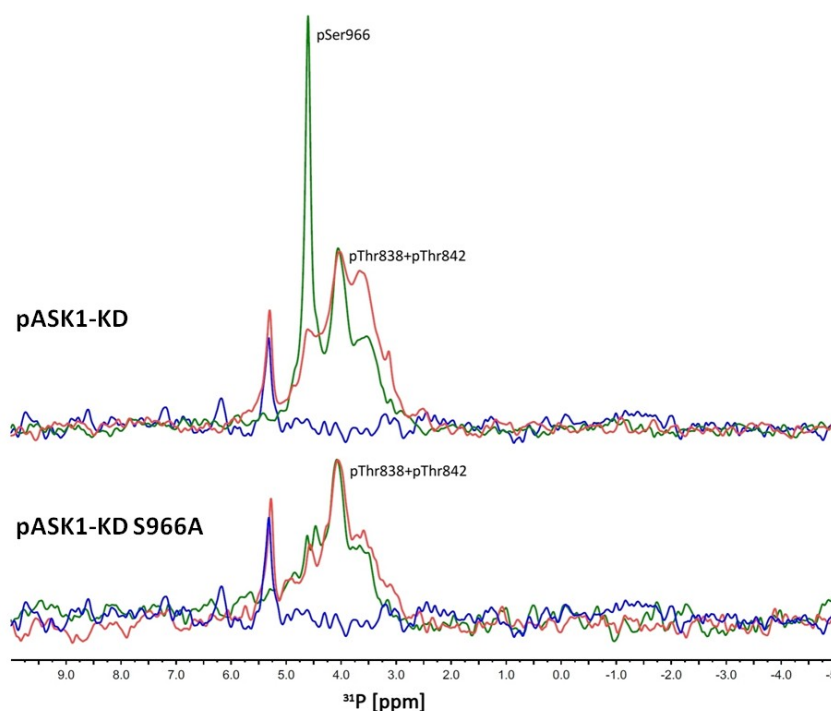
Obr. 5.5 Vícestavový model komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC. Výsledný třístavový model, ve kterém dva stavy jsou kompaktní s 43% (Stav 2) a 18% (Stav 3) pravděpodobností výskytu a jeden rozvolněný stav s 39% pravděpodobností výskytu. 14-3-3 ζ ΔC je znázorněno hnědou barvou a pASK1-KD barvou modrou. Tento vícestavový model vykazuje výbornou shodu s experimentálními rozptylovými křivkami ($\chi^2 = 0,94$). Vícestavová analýza na základě SAXS rozptylových křivek byla provedena pomocí serveru MultiFoXS (Raveh *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2015).

Vzhledem k tomu, že Kratkeho výnos naznačil vyšší flexibilitu komplexu (Obr. 5.3C), bylo použito vícecestavové modelování komplexu za pomoci MultiFoXS metody, která umožňuje modelování konformačně heterogenních komplexů (Raveh *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2015). Výsledný model je složen z populačně vážené kombinace tří konformačních stavů a poskytuje velmi dobrou shodu se SAXS experimentálními daty ($\chi^2 = 0,94$). Použitím populačně vážené kombinace dvou, čtyř nebo pěti stavů nebyl získán model, který by se lépe shodoval s experimentálními SAXS daty. Výsledný třístavový model je váženou kombinací dvou kompaktních a jednoho rozvolněného stavu (Obr. 5.5). Populační váhy prvních dvou kompaktních stavů, ve kterých C-koncový lalok jednoho dimeru ASK1-KD interaguje buď s α -helixem H6 nebo ohyby mezi helixy H2-H3 a H4-H5 proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, jsou 43% ($R_g = 41,6$ Å; $D_{max} = 153,5$ Å) a 18% ($R_g = 37,9$ Å; $D_{max} = 139,0$ Å). Populační váha rozvolněného stavu je 39% ($R_g = 56,6$ Å; $D_{max} = 214,3$ Å), ve kterém 14-3-3 $\zeta\Delta$ C a ASK1-KD nemají přímý kontakt, ale jsou spojeny prostřednictvím C-koncového segmentu ASK1-KD. Dobrá shoda tohoto třístavového modelu s experimentálními SAXS daty podporuje hypotézu, že komplex pASK1-KD:14-3-3 $\zeta\Delta$ C je v roztoku konformačně heterogenní. Konformace třístavového modelu jsou také plně v souladu s výsledky chemického zesílení (viz publikace I).

5.1.4 Vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje konformaci aktivního místa ASK1-KD

Strukturní modelování ukázalo, že 14-3-3 ζ pravděpodobně interaguje s C-koncovým lalokem pASK1-KD v těsné blízkosti jak aktivního místa, tak i aktivačního segmentu jednoho protomeru ASK1. Na základě těchto výsledků vznikla hypotéza, že vazba proteinu 14-3-3 může ovlivnit konformaci této oblasti. Vzhledem k tomu, že se v sekvenci aktivačního segmentu ASK1 vyskytují dvě autofosforylační místa, které jsou fosforylovány i v naší rekombinantní ASK1-KD (pThr³⁸³ a pThr⁸⁴², viz Obr. S1, publikace I), byl proveden ³¹P-NMR experiment s cílem charakterizovat strukturní změny v této oblasti při tvorbě komplexu pASK1-KD:14-3-3 $\zeta\Delta$ C. ³¹P-NMR spektrum pASK1-KD samotné ukázalo silný a úzký rezonanční signál při 4,6 ppm a dva překrývající se rezonanční signály při 3–4,25 ppm (Obr. 5.6). Všechny tyto signály se vyskytují v oblasti 3–5 ppm, což je v souladu s očekávanými chemickými posuny pro pSer a pThr při neutrálním pH (Bock *et al.*, 1975). Spektrum samotného mutantu pASK1-KD S966A, který neinteraguje s proteinem 14-3-3, ukázalo rezonanční signály pouze v oblasti 3–4,25

ppm. Z toho můžeme usuzovat, že rezonanční signál při 4,6 ppm, který byl detekován při měření pASK1-KD WT odpovídá jádru ^{31}P , které je součástí fosfátové skupiny na pSer⁹⁶⁶. Malá šířka tohoto signálu bude pravděpodobně odrážet velkou flexibilitu C-koncového segmentu, kde se tento fosfoserinový zbytek vyskytuje. Dvě velké překrývající se rezonance při 3–4,25 ppm pravděpodobně odpovídají jádrům ^{31}P , které jsou součástí fosfátových skupin na autofosforylačních místech pThr⁸³⁸ a pThr⁸⁴².



Obr. 5.6: Porovnání spekter ^{31}P nukleární magnetické rezonance ASK1-KD a ASK1-KD S966A a jejich komplexů s proteinem 14-3-3 ζ ΔC. Zelené spektrum odpovídá samotné ASK1-KD, modré spektrum odpovídá samotnému 14-3-3 ζ ΔC a červené spektrum odpovídá komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ ΔC. Data byla měřena při 23°C a při ^{31}P rezonanční frekvenci 202,4 MHz.

Spektrum samotného 14-3-3 ζ ΔC odhalilo jediný signál při 5,25 ppm, což nejspíš znamená, že rekombinantní 14-3-3 ζ ΔC obsahuje ve své molekule jeden slabě fosforylovaný fosfoserinový či fosfothreoninový zbytek. Přídavek 14-3-3 ζ ΔC k pASK1-KD WT jednak velmi výrazně potlačil rezonanční signál při 4,6 ppm, pravděpodobně díky vazbě fosforylovaného C-koncového segmentu do vazebného žlábků 14-3-3, a dále změnil poměr intenzit signálů v oblasti 3–4,25 ppm. Ve spektru pASK1-KD S966A nebyly v přítomnosti 14-3-3 ζ ΔC pozorovány žádné změny. To potvrzuje hypotézu, že vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje lokální prostředí a dynamiku v okolí pThr⁸³⁸ a pThr⁸⁴², což lze interpretovat jako ovlivnění konformace aktivačního segmentu v molekule pASK1-KD. Dále silné potlačení rezonančního signálu při 4,6 ppm v přítomnosti 14-3-3 indikuje, že

výměna mezi volnou a vázanou pASK1-KD probíhá na časové škále NMR experimentu a účastní se jí oba protomery ASK1-KD.

5.1.5 Vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje fluorescenční vlastnosti tryptofanového zbytku v aktivačním segmentu ASK1-KD

Pro další ověření hypotézy, že protein 14-3-3 ovlivňuje strukturu aktivačního segmentu ASK1 bylo změřeno časově rozlišené dohasínání intensity a anizotropie tryptofanové fluorescence. Bodovou mutagenézí byly připraveny dva nové konstrukty ASK1-KD, které obsahují ve své sekvenci jediný tryptofanový zbytek a to v pozici 770 (ASK1-KD W⁷⁷⁰) a v pozici 823 (ASK1-KD W⁸²³). Mutant ASK1-KD W⁷⁷⁰ byl připraven mutací W865F a mutant ASK1-KD W⁸²³ byl připraven mutacemi W770F, W865F a F823W. U tohoto experimentu je možné sledovat strukturní změny v okolí tryptofanových zbytků při asociaci s vazebným partnerem. Tryptofanový zbytek Trp⁷⁷⁰ je v molekule ASK1 umístěn na C-konci helixu α D a tryptofanový zbytek Trp⁸²³ se vyskytuje přímo v aktivačním segmentu. Stabilita připravených mutantů byla ověřena metodou diferenční skenovací fluorimetrie, při které dochází k tepelně indukované proteinové denaturaci. Vzhledem k tomu, že mezi připravenými mutanty nebyly pozorovány žádné významné změny v denaturačních teplotách (viz Tab. S2, příloha k publikaci I), vnesené mutace pravděpodobně neměly výrazný vliv na terciární strukturu ASK1-KD, a tak byly použity k časově rozlišeným fluorescenčním experimentům. K těmto experimentům byl použit konstrukt 14-3-3 se všemi tryptofanovými zbytky zaměněnými za zbytky fenylalaninové, tzv. 14-3-3 ζ noW. Měření dohasínání intenzity fluorescence ukázalo, že při vzniku komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ noW je střední doba života excitovaného stavu (τ_{mean}) ASK1-KD W⁸²³ zkrácena z hodnoty 5,8 na 5,4 ns (Tab. 5.2).

Tabulka 5.2: Přehled časově rozlišeného dohasínání fluorescence pASK1-KD

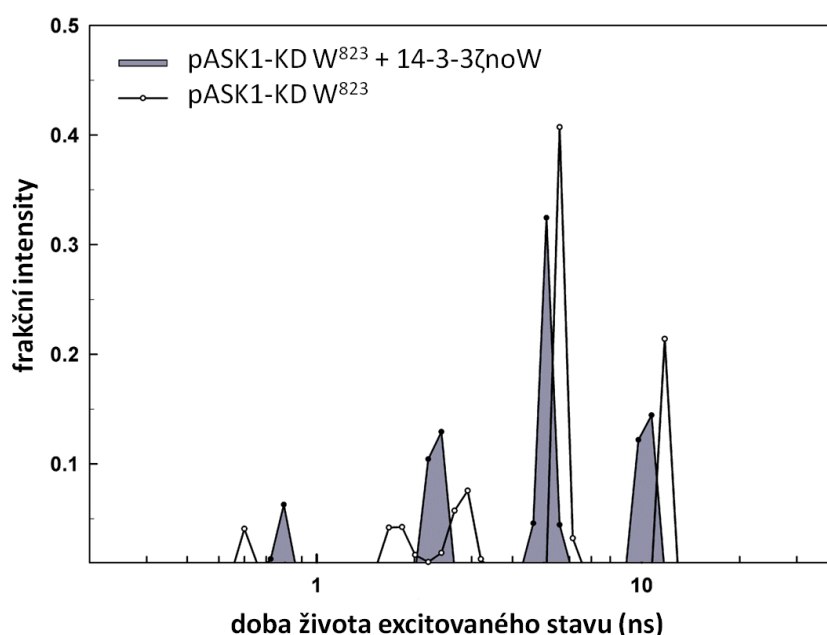
Vzorek	$\tau_{\text{mean}}^{a,b}$ (ns)	β_1^c	Φ_1 (ns)	β_2	Φ_2 (ns)	β_3	Φ_3 (ns)	β_4	Φ_4 (ns)
pASK1-KD W ⁸²³	5,8	0,04	2,5	-	-	0,11	17,8	0,03	200
pASK1-KD W ⁸²³ +14-3-3 ζ noW	5,4	0,04	3,3	0,01	8,5	0,12	37,5	-	-
pASK1-KD W ⁷⁷⁰	5,7	0,04	2,5	-	-	0,12	17,1	0,04	200
pASK1-KD W ⁷⁷⁰ +14-3-3 ζ noW	5,5	0,03	1,6	0,07	10,2	0,09	41,1	-	-

^a Střední doba života fluoroforu (τ_{mean}) byla vypočítána pomocí Rovnice 2 (viz kap. 4.7.1).

^b Směrodatná odchylka $\pm 0,1$ ns

^c Anizotropie fluorescence $r(t)$ byla analyzována jako soubor exponenciálních funkcí (Rovnice 3, kap. 4.7.2), kde amplitudy β_i reprezentují distribuci rotačně-korelačních časů Φ_i .

Distribuce dob života excitovaného stavu (Obr. 5.7), ukazuje, že zkrácení střední doby života excitovaného stavu je při vazbě 14-3-3ζnoW zapříčiněno především zkrácením dvou nejdelších komponent reprezentujících téměř 70% celkového signálu. Tyto dvě komponenty ovlivňují výslednou hodnotu střední doby života excitovaného stavu nejvíce (Rovnice 2, kap. 4.7.1). Efekt vazby 14-3-3ζnoW na střední dobu života excitovaného stavu ASK1-KD W⁷⁷⁰ byl výrazně slabší (Tab. 5.2). Zkrácení střední doby života excitovaného stavu znamená nárůst polarity prostředí v těsné blízkosti zbytku Trp⁸²³ nebo změnu ve zhašecích interakcích při tvorbě komplexu. Tento výsledek je v souladu s hypotézou, že vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje konformaci aktivačního segmentu pASK1-KD.



Obr. 5.7: Porovnání distribucí dob života excitovaného stavu pASK1-KD W⁸²³ v nepřítomnosti a v přítomnosti 14-3-3ζnoW. Distribuce komponent dob života excitovaného stavu pASK1-KD W⁸²³ v nepřítomnosti 14-3-3ζnoW je znázorněna plochami bez výplně a distribuce komponent dob života excitovaného stavu pASK1-KD W⁸²³ v přítomnosti 14-3-3ζnoW je znázorněna plochami vyplněnými šedou barvou. Z distribuce je viditelný posun dvou nejdelších komponent při vazbě 14-3-3ζnoW směrem ke kratším dobám života, což má za následek zkrácení střední doby života excitovaného stavu Trp⁸²³ při vazbě proteinu 14-3-3ζnoW.

Analýza dohasínání anizotropie fluorescence samotné pASK1-KD odhalila tři rotačně-korelační časy. Jeden krátký ($\Phi_1 = 2,5$ ns), druhý přibližně 18 ns (Φ_3) a třetí velmi dlouhý, nerozlišený ($\Phi_4 > 200$ ns; Tab. 5.2). Zatímco Φ_1 pravděpodobně odpovídá rychlým segmentálním pohybům, hodnota Φ_3 je nejspíš výsledkem celkové rotace pASK1-KD,

vzhledem k tomu, že tato hodnota je typická pro rotační pohyb globulárních proteinů s relativní molekulovou hmotností přibližně 70 000 (Lakowicz, 2006). Dlouhý rotačně-korelační čas Φ_4 je nerozlišený s krátkou dobou života tryptofanové fluorescence a pravděpodobně poukazuje na přítomnost agregátů ve vzorcích. Pro oba mutanty, tvorba komplexu prodloužila rotačně-korelační čas Φ_3 na hodnoty odpovídající celkovému rotačnímu pohybu proteinu o relativní molekulové hmotnosti 110 000–150 000 (Lakowicz, 2006), z čeho vyplývá, že se v roztoku pravděpodobně vytvořil komplex. Při tvorbě komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ noW se při měření objeví nová komponenta rotačně-korelačního času Φ_2 (Tab. 5.2), která svou délkou nejspíš odráží pohyby domén pASK1-KD v komplexu nebo asymetričnost a strukturní heterogenitu, stejně jak tomu bylo v případě SAXS analýzy.

5.1.6 Diskuse

Na základě umístění 14-3-3 vazebného motivu v rámci sekvence molekuly ASK1 blízko katalytické domény (25 aminokyselinových zbytků od konce KD) lze uvažovat, že vazba proteinu 14-3-3 může modulovat strukturu této domény nebo také přístupnost jejího aktivního místa. Stejně tak je tomu v případě dalších enzymů, které jsou regulovány prostřednictvím proteinu 14-3-3 (Obsil *et al.*, 2001; Kopecka *et al.*, 2014; Alblova *et al.*, 2017). Cílem této práce bylo prověření této hypotézy provedením strukturní analýzy komplexu mezi 14-3-3 ζ a ASK1-KD. *Ab initio* rekonstrukce tvaru molekulové obálky komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ Δ C na základě SAXS dat naznačuje, že dimery ASK1-KD a 14-3-3 ζ Δ C jsou vůči sobě uspořádány asymetricky. Vzhledem k tomu, že oba proteiny tvoří dimery s dvoučetnou rotační symetrií je toto zjištění překvapivé. Z analýzy také vyplývá, že molekula komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ Δ C je složena z několika rigidních domén, které jsou spojeny segmenty s více kompaktní konformací (Obr. 5.3C). Podobné uspořádání bychom našli také např. u p47^{phox}, aktivátoru NADPH oxidasy (Receveur-Brechot *et al.*, 2012; Durand *et al.*, 2006). Tato představa o struktuře komplexu byla dále podpořena pomocí strukturního modelování, které odhalilo, že jedině model založený na vážené kombinaci více konformerů je konzistentní s experimentálními SAXS daty (Obr. 5.5). To naznačuje, že komplex pASK1-KD:14-3-3 ζ Δ C je konformačně heterogenní. Nepřítomnost velkého a dobře definovaného interakčního povrchu mezi 14-3-3 ζ a ASK1-KD, kromě interakce fosforylovaného 14-3-3 vazebného motivu ASK1 s vazebným místem 14-3-3, je ve shodě s nízkou vazebnou afinitou určenou na základě SV AUC (Obr.

5.1). Navržený strukturní model také vysvětluje stechiometrii komplexu 2:2, ve kterém jeden dimer 14-3-3 ζ interaguje s jedním dimerem ASK1-KD, přičemž vždy vazebné místo jednoho protomeru proteinu 14-3-3 a jeden 14-3-3 vazebný motiv ASK1-KD zůstává volný. Vznik komplexu s vyšší stechiometrií však nebyl v našich experimentálních podmínkách nikdy pozorován ani v přítomnosti velkého nadbytku jednoho z vazebných partnerů (Obr. 5.1). Konformační flexibilita pravděpodobně způsobuje sterické zábrany a zabraňuje tak vzniku komplexů s vyššími vazebnými stechiometriemi. To na druhou stranu nevylučuje možnost, že uvnitř multiproteinového ASK1 signalosomu dimer proteinu 14-3-3 interaguje s ASK1 a také současně s jinými proteiny, např. ASK2 (Cockrell *et al.*, 2010). Navíc navržený strukturní model komplexu pASK1-KD:14-3-3 ζ Δ C také vysvětluje pozorovanou částečnou inhibici katalytické aktivity ASK1-KD v přítomnosti proteinu 14-3-3 (Obr. 5.2), protože pouze jeden protomer ASK1-KD se vyskytuje v těsné blízkosti povrchu proteinu 14-3-3 a je tak inhibován. Strukturní analýza také naznačila, že 14-3-3 ζ interaguje nejen s fosforylovaným motivem obsahujícím pSer⁹⁶⁶, ale také s několika oblastmi z C-koncového laloku ASK1-KD v blízkosti aktivního místa (Obr. 5.5). I když se nejspíše jedná o dočasné kontakty, je pravděpodobné, že by mohly mít vliv na strukturu či přístupnost aktivního místa. Podobný způsob regulace byl pozorován i u jiných proteinkinas modulovaných prostřednictvím protein-proteinových interakcí. Například cyklin-dependentní kinasa 2 je aktivována přes konformační změnu vyvolanou cyklinem A, která má za následek přeuspořádání aminokyselinových zbytků aktivního místa a společně s konformační změnou aktivačního segmentu uvolňuje přístup do aktivního místa (Jeffrey *et al.*, 1995). Na straně druhé, inhibice proteinkinasy PKA je založena na přímé interakci aktivačního segmentu s regulační podjednotkou (Kim *et al.*, 2005). Dalším příkladem je inhibice kinasy p38 α kinasou MAPK-aktivovanou proteinkinasou 2, která při tvorbě komplexu blokuje přístup k aktivnímu místu p38 α (White *et al.*, 2007). Výsledky ³¹P NMR a časově rozlišeného dohasínání fluorescence (Obr. 5.6; Obr. 5.7; Tab. 5.2) naznačily, že vazba proteinu 14-3-3 ζ ovlivňuje konformaci aktivačního segmentu molekuly ASK1-KD, což podporuje hypotézu, že protein 14-3-3 ζ interaguje s pASK1-KD v těsné blízkosti jejího aktivního místa. To může znamenat, že protein 14-3-3 ζ může inhibovat pASK1-KD prostřednictvím několika mechanismů včetně strukturní modulační jejího aktivního místa, sterické blokace fosforylace Thr⁸³⁸ nebo také blokace interakce mezi ASK1 a jejími substráty.

5.1.7 Shrnutí výsledků z publikace I

V této studii jsme provedli strukturní charakterizaci komplexu pASK1-KD:14-3-3 Δ C s nízkým rozlišením. SAXS měření odhalila, že komplex pASK1-KD:14-3-3 Δ C je v roztoku konformačně heterogenní. Navíc strukturní analýza společně s daty ^{31}P NMR a časově rozlišené tryptofanové fluorescence napověděly, že protein 14-3-3 ζ interaguje s katalytickou doménou ASK1 v těsné blízkosti jejího aktivního místa, proto tato interakce má vliv na strukturu aktivního místa nebo také jeho přístupnost.

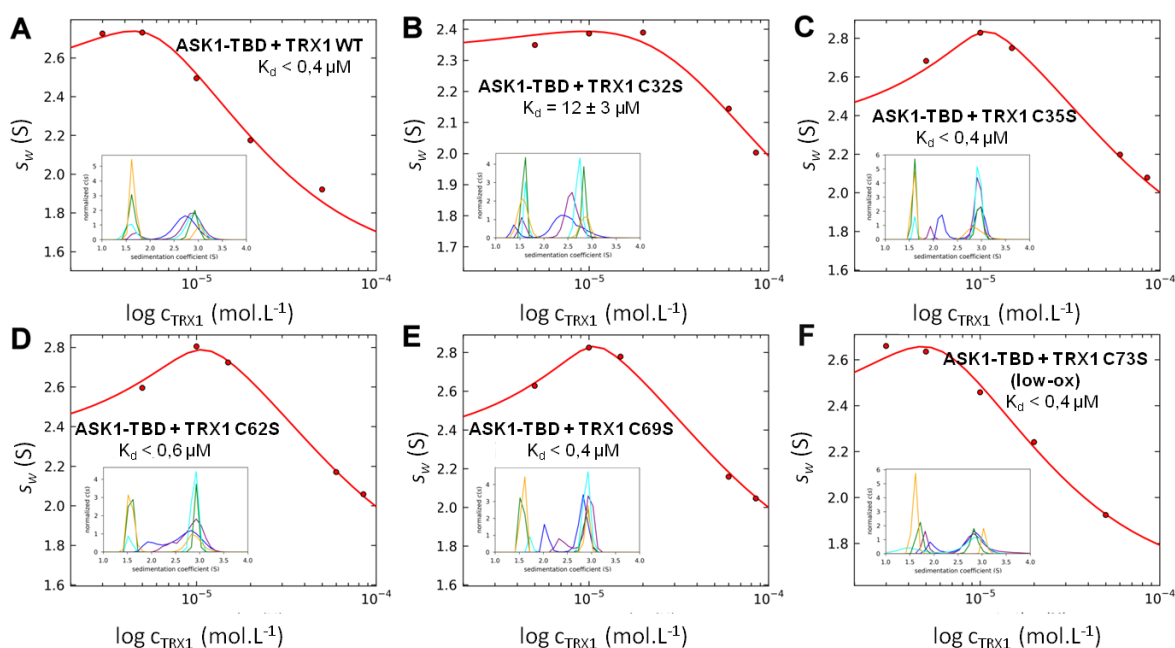
5.2 Role cysteinových zbytků při interakci thioredoxin-vazebné domény ASK1 a thioredoxinu (publikace II)

Dalším fyziologickým inhibitorem ASK1 je protein thioredoxin (TRX), který je také součástí ASK1 signalosomu a za nestresových podmínek interaguje s její N-koncovou částí (Tobium *et al.*, 2002). V případě oxidačního stresu molekula thioredoxinu, stejně jako 14-3-3, disociuje a dochází tak k aktivaci ASK1 (Goldman *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2000; Fujino *et al.*, 2007). Dosud se ví, že N-koncová thioredoxin-vazebná doména ASK1 (ASK1-TBD) je monomerní protein, který interaguje s redukováným TRX1 s molární stechiometrií 1:1 skrze relativně velký interakční povrch bez dramatické konformační změny (Kosek *et al.*, 2014). Nicméně, molekulární mechanismus disociace komplexu ASK1-TBD:TRX1 při oxidačním stresu není dosud zcela objasněn. Předpokládá se, že v tomto procesu mohou hrát důležitou roli cysteinové zbytky obou proteinů (Liu a Min, 2002; Saitoh *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2011; Nadeau *et al.*, 2009; Kosek *et al.*, 2014). V této práci byla proto zkoumána role cysteinových zbytků v rámci molekul TRX1 a ASK1-TBD při jejich interakci v redukujících a oxidačních podmínkách.

5.2.1 Význam Cys³² v molekule TRX1 při interakci s ASK1-TBD

Hlavním cílem této práce bylo prozkoumat význam jednotlivých cysteinových zbytků v interakci mezi TRX1 a ASK1-TBD. Nejprve byla zaměřena pozornost na TRX1 a bodovou mutagenézí byly připraveny mutanty TRX1, které měly vždy jeden z pěti cysteinových zbytků zaměněny za serinový zbytek (C32S, C35S, C62S a C69S). Z literatury je známo, že mutace těchto zbytků nemá významný vliv na strukturu molekuly TRX1 (Qin *et al.*, 1994; Weichsel *et al.*, 1996). Molekula TRX1 obsahuje ve své sekvenci ještě jeden cysteinový zbytek Cys⁷³ a v práci kolegy Mgr. Dalibora Koška PhD. a kol. (Kosek *et al.*, 2014) byla metodou SV AUC v redukujících podmínkách stanovena hodnota zdánlivé disociační konstanty K_d komplexu ASK1-TBD:TRX1 C73S přibližně na 0,3 μ M (Tab. 5.3). Stejným způsobem byla charakterizována vazebná afinita ostatních připravených mutantů TRX1 k ASK1-TBD. Pro každý mutant byla změřena škála různých molárních poměrů ASK1-TBD k redukovánému TRX1 pomocí SV AUC a poté byly vyhodnoceny jejich zdánlivé disociační konstanty metodou konstrukce vazebných izoterm vážených průměrů sedimentačních koeficientů (s_w vazebných izoterm), které jsou funkcí

koncentrace mutantů TRX1 (Obr. 5.8A–E, Tab. 5.3). Na obrázku 5.8 jsou do každé s_w isotermy vloženy miniatury sérií normalizovaných $c(s)$ distribucí, na základě kterých byly dané s_w izotermy zkonstruovány. SV AUC analýza ukázala, že jedině mutant TRX1 C32S se váže k ASK1-TBD s výrazně nižší vazebnou afinitou (Obr. 5.9B, Tab. 5.3) s $K_d = 12 (\pm 3) \mu\text{M}$, zatímco všechny ostatní varianty TRX1 mají k ASK1-TBD podobnou afinitu jako TRX1 WT s $K_d < 0,6 \mu\text{M}$. Na základě těchto výsledků lze usoudit, že mezi všemi pěti cysteinovými zbytkami TRX1, je právě Cys³² zodpovědný za vysokou afinitu molekuly TRX1 vůči ASK1-TBD při redukujících podmínkách.



Obr. 5.8: s_w izotermy zkonstruované na základě SV AUC analýzy komplexů mezi mutanty TRX1 a ASK1-TBD. Vážené průměry sedimentačních koeficientů s_w byly vypočítány na základě $c(s)$ distribucí (vložené miniatury v každé s_w izotermě), ve kterých byly měřeny různé molární poměry TRX1 (3–85 μM) k ASK1-TBD (5 μM). Zdánlivá disociační konstanta byla určena nelineární regresí v průběhu fitování experimentálních dat v programu SEDPHAT (Schuck, 2003). A) Redukovaný TRX1 WT a ASK1-TBD WT. B) Redukovaný TRX1 C32S a ASK1-TBD WT. C) Redukovaný TRX1 C35S a ASK1-TBD WT. D) Redukovaný TRX1 C62S a ASK1-TBD WT. E) Redukovaný TRX1 C69S a ASK1-TBD WT. F) Oxidovaný TRX1 C69S (low-ox podmínky) a ASK1-TBD WT.

Z literatury je již známo, že tvorba disulfidického můstku mezi katalytickými cysteinovými zbytkami Cys³² a Cys³⁵ je zodpovědná za disociaci TRX1 od ASK1-TBD (Saitoh *et al.*, 1998; Liu a Min, 2002; Fujino *et al.*, 2007). Nicméně oxidace TRX1 vede k tvorbě ještě jednoho disulfidického můstku v molekule TRX1, a to mezi Cys⁶² a Cys⁶⁹. Tyto dva zbytky jsou od sebe vzdáleny 17 Å, takže rozhodně tato oxidace má vliv na

strukturu TRX1 (Hashemy a Holmgen, 2008; Watson *et al.*, 2003; Weichsel *et al.*, 1996). Pro zjištění role vzniku tohoto cystinového můstku, byl TRX1 oxidován H_2O_2 po dobu 15 minut při 37 °C při dvou různých molárních poměrech TRX1: H_2O_2 (tzv. „low-ox“ podmínkami byl nazýván poměr TRX1: H_2O_2 = 1:5 a tzv. „high-ox“ podmínkami byl nazýván poměr TRX1: H_2O_2 = 1:100). Bylo ukázáno, že oxidace TRX1 za „high-ox“ podmínek vede k tvorbě dvou disulfidických můstků (mezi Cys³² a Cys³⁵ a mezi Cys⁶² a Cys⁶⁹), zatímco oxidace TRX1 za „low-ox“ podmínek vede k tvorbě pouze jednoho disulfidického můstku mezi katalytickými Cys³² a Cys³⁵ (Hashemy a Holmgen, 2008). V práci kolegy Mgr. Dalibora Koška PhD. a kol. (Kosek *et al.*, 2014) byla metodou SV AUC v „high-ox“ podmínkách stanovena hodnota K_d komplexu ASK1-TBD:TRX1 C73S na $6 (\pm 2)$ μM (Tab. 5.3). Stejným způsobem byla v této publikaci charakterizována vazebná afinita TRX1 C73S k ASK1-TBD v „low-ox“ podmínkách a hodnota K_d byla určena na $4 (\pm 2)$ μM (Obr. 5.8F, Tab. 5.3). Malá změna ve vazebných afinitách ASK1-TBD k TRX1 C73S oxidovanému za „high-ox“ podmínek a za „low-ox“ podmínek naznačuje, že vznik disulfidického můstku mezi cysteinovými zbytkami Cys⁶² a Cys⁶⁹ nehraje žádnou významnou roli při disociaci komplexu ASK1-TBD:TRX1 při oxidaci TRX1.

Tabulka 5.3: Vazebné afinity TRX1 mutantů k ASK1-TBD

TRX1 mutant	K_d^a (μM)
WT redukováný	< 0,4
C32S redukováný	12 ± 3
C35S redukováný	< 0,4
C62S redukováný	< 0,6
C69S redukováný	< 0,4
C73S redukováný ^b	$0,3 \pm 0,1$
C73S low-ox	4 ± 2
C73S high-ox ^b	6 ± 2

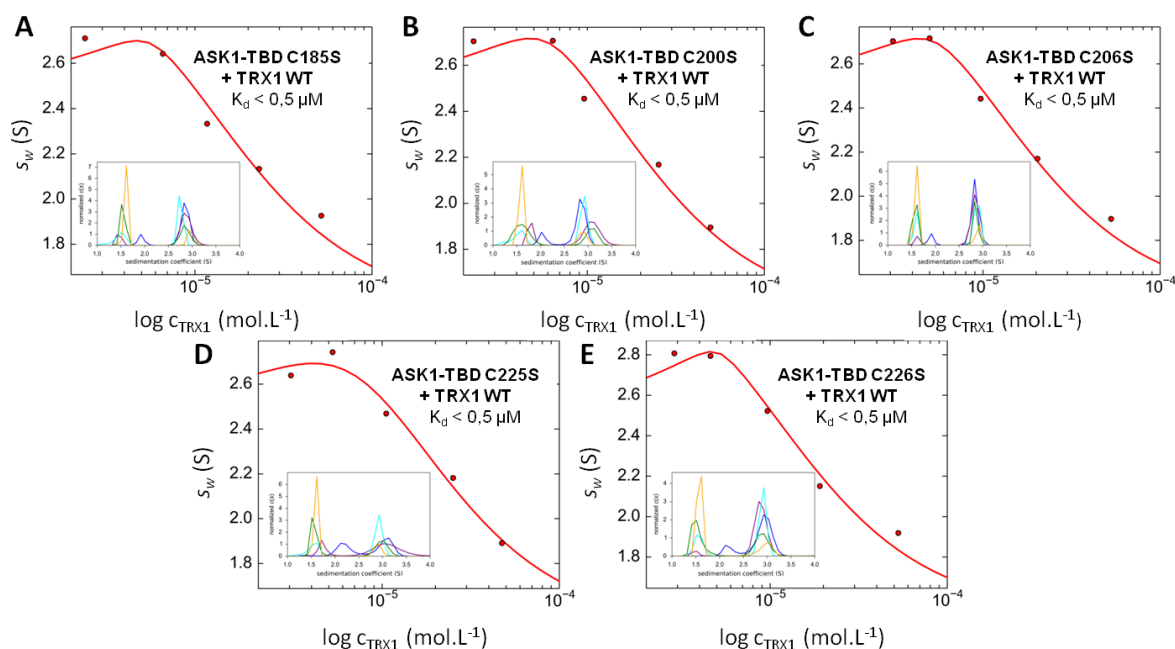
^a Hodnoty K_d a odchylky byly stanoveny konstrukcí s_w izoterem jako funkce koncentrace TRX1

^b Hodnoty K_d byly publikovány v práci (Kosek *et al.*, 2014)

5.2.2 Význam cysteinových zbytků v molekule ASK1-TBD při interakci s TRX1

Dalším krokem bylo prozkoumat význam jednotlivých cysteinových zbytků v molekule ASK1-TBD při interakci s TRX1. Bodovou mutagenézí byly připraveny mutanty ASK1-TBD, které měly vždy jeden ze sedmi cysteinových zbytků zaměněný za serinový zbytek (C120S, C185S, C200S, C206S, C225S a C226S). Stabilita připravených mutantů byla ověřena metodou DSF. Žádné změny v denaturační teplotě mezi

připravenými mutantami nebyly pozorovány s výjimkou mutantu ASK1-TBD C120S, u kterého byla hodnota denaturační teploty T_D přibližně o 7 °C nižší v porovnání s ostatními mutanty ASK1-TBD. Výrazně nižší hodnota T_D pravděpodobně znamená, že tato mutace vyvolává destabilizaci terciární struktury v molekule ASK1-TBD, proto byl mutant ASK1-TBD C120S vyloučen z dalších experimentů. Pro mutanty ASK1-TBD C185S, C200S, C206S, C225S a C226S byla změřena škála různých molárních poměrů ASK1-TBD k redukovanému TRX1 pomocí SV AUC a poté byly vyhodnoceny jejich zdánlivé disociační konstanty metodou konstrukce s_w vazebných izoterm (Obr. 5.9, Tab. 5.4).



Obr. 5.9: s_w izotermie zkonstruované na základě SV AUC analýzy komplexů mezi TRX1 WT a mutanty ASK1-TBD. Vážené průměry sedimentačních koeficientů s_w byly vypočítány na základě $c(s)$ distribucí (vložené miniatury v každé s_w isotermě), ve kterých byly měřeny různé molární poměry TRX1 (3–50 μM) k ASK1-TBD (5 μM). Zdánlivá disociační konstanta byla určena nelineární regresí v průběhu fitování experimentálních dat v programu SEDPHAT (Schuck, 2003). A) Redukovaný TRX1 WT a ASK1-TBD C185S. B) Redukovaný TRX1 WT a ASK1-TBD C200S. C) Redukovaný TRX1 WT a ASK1-TBD C206S. D) Redukovaný TRX1 WT a ASK1-TBD C225S. E) Redukovaný TRX1 WT a ASK1-TBD C226S.

Na obrázku 5.9 jsou do každé s_w isotermie vloženy miniatury sérií normalizovaných $c(s)$ distribucí, na základě kterých byly dané s_w izotermie zkonstruovány. Tato analýza ukázala, že připravené mutanty ASK1-TBD mají podobnou afinitu k TRX1 WT jako ASK1-TBD WT (Tab. 5.4). V práci kolegy Mgr. Dalibora Koška Ph.D. a kol. (Kosek *et al.*, 2014) byla metodou SV AUC v redukujících podmínkách stanovena hodnota K_d

komplexu ASK1-TBD C250S:TRX1 C73S na $50 (\pm 10) \mu\text{M}$. To znamená, že v sekvenci ASK1-TBD jedině cysteinový zbytek Cys²⁵⁰ se může přímo zúčastňovat vazby na molekulu TRX1 nebo jeho mutace může také vyvolat strukturní změnu v interakčním povrchu molekuly TRX1, ale bez destabilizace celkové terciární struktury ASK1-TBD, jak naznačují výsledky DSF.

Tabulka 5.4: Vazebné afinity ASK1-TBD mutantů k TRX1 v redukujících podmínkách

ASK1-TBD mutant	K_d^a (μM)
C185S	< 0,5
C200S	< 0,5
C206S	< 0,5
C225S	< 0,5
C226S	< 0,5
C250S ^b	50 ± 10

^a Hodnoty K_d a odchylky byly stanoveny konstrukcí s_w izotermem jako funkce koncentrace TRX1

^b Hodnoty K_d byly publikovány v práci Kosek *et al.*, 2014

5.2.3 Diskuse

Hlavním cílem této studie bylo prozkoumat význam role cysteinových zbytků při interakci mezi TRX1 a ASK1-TBD, která je destabilizována oxidačním stresem. Z předešlých studií je známo, že oxidace molekuly TRX1 je hlavním faktorem zodpovědným za disociaci komplexu TRX1:ASK1-TBD při oxidačním stresu (Saitoh *et al.*, 1998; Liu a Min, 2002; Fujino *et al.*, 2007). Oxidace TRX1 vyvolává tvorbu intramolekulárních disulfidických můstků mezi katalytickými cysteinovými zbytky Cys³² a Cys³⁵ a vzhledem k tomu, že strukturní studie neodhalily žádné dramatické změny v molekule TRX1 při tvorbě tohoto disulfidického můstku (Qin *et al.*, 1994; Weichsel *et al.*, 1996), je na místě spekulovat, jestli jeden nebo oba tyto cysteinové zbytky nejsou přímo zapojeny do vazby TRX1 k ASK1-TBD. Vazebné experimenty s cysteinovými mutanty TRX1 odhalily, že pouze mutant TRX1 C32S váže ASK1-TBD s výrazně nižší afinitou, což silně napovídá, že mezi dvěma katalytickými cysteinovými zbytky bude Cys³² tím, který je důležitý pro vazbu TRX1 k ASK1-TBD s vysokou afinitou v redukujících podmínkách (Obr. 5.8, Tab. 5.3). Cys³² je v sekvenci umístěn hned vedle tryptofanového zbytku Trp³¹, u kterého bylo také ukázáno, že se zúčastňuje vazby TRX1 na ASK1-TBD (Kosek *et al.*, 2014), což naznačuje, že katalytický motiv W₃₁CGPC₃₅ je důležitou součástí ASK1 vazebného povrchu v molekule TRX1. Na rozdíl od zbytku Cys³⁵, je zbytek Cys³² umístěn na povrchu TRX1 (Obr. 2.8) a má signifikantně nižší hodnotu pK_a (~ 6,7) (Kallis a Holmgren, 1980).

Jestli je tento fakt důležitý pro interakci mezi TRX1 a ASK1-TBD je nejasné, ale je celkem dost možné, že thiolát Cys³² v molekule TRX1 může být zahrnut jak v coulombických, tak v interakcích síra-aromát s ASK1-TBD a tvorba disulfidického můstku mezi těmito dvěma zbytky zasahuje do těchto interakcí, čímž je komplex destabilizován.

Lidský TRX1 obsahuje ve své sekvenci tři cysteinové zbytky, které nejsou součástí aktivního centra: Cys⁶², Cys⁶⁹ a Cys⁷³, mezi kterými Cys⁶² a Cys⁶⁹ tvoří intramolekulární disulfidickou vazbu při silných oxidačních podmínkách a tvorba tohoto cystinového můstku bude pravděpodobně silně ovlivňovat konformaci TRX1 tím, že naruší strukturu helixu $\alpha 3$ v molekule TRX (Obr. 2.8; Watson *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2011). Proto bylo dále zkoumáno, jestli tvorba tohoto disulfidického můstku nemá přídavný efekt na vazebnou afinitu mezi oxidovaným TRX1 a ASK1-TBD. Nicméně naše vazebné experimenty odhalily, že TRX1, který má vytvořený pouze jeden cystinový můstek mezi katalytickými cysteinovými zbytkami Cys³² a Cys³⁵ (TRX1 C73S oxidovaný při tzv. „low-ox“ podmínkách) váže ASK1-TBD s podobnou afinitou jako TRX1 C73S mutant oxidovaný při „high-ox“ podmínkách (Kosek *et al.*, 2014; Obr. 5.8 F, Tab. 5.3). To naznačuje, že vznik intramolekulárního disulfidického můstku mezi katalytickými Cys³² a Cys³⁵ je hlavním faktorem vedoucím k disociaci komplexu ASK1-TBD:TRX1 při oxidaci TRX1 a že oblast obsahující zbytky Cys⁶² a Cys⁶⁹ (helix $\alpha 3$, Obr. 2.8) není součástí ASK1-TBD vazebného povrchu molekuly TRX1. Mezi cysteinovými zbytkami v ASK1-TBD je Cys²⁵⁰ jediným zbytkem, který je klíčový pro vazbu k TRX1 a jeho mutace vede ke snížené afinitě k molekule TRX1 (Tab. 5.4).

5.2.4 Shrnutí výsledků z publikace II

Můžeme shrnout, že tvorba cystinových můstků ovlivňuje oblasti ASK1-TBD, které jsou přímo zapojeny nebo jsou důležité pro vazbu TRX1. Výsledky této publikace dále ukazují, že cysteinový zbytek Cys³² redukovaného TRX1 je zodpovědný za jeho vysokou vazebnou afinitu k ASK1-TBD. Tvorba cystinového můstku mezi Cys³² a Cys³⁵ je hlavním faktorem, který je zodpovědný, za disociaci komplexu ASK1-TBD:TRX1 při oxidaci. V případě ASK1-TBD je Cys²⁵⁰ jediným cysteinovým zbytkem, který je klíčový pro vazbu k TRX1.

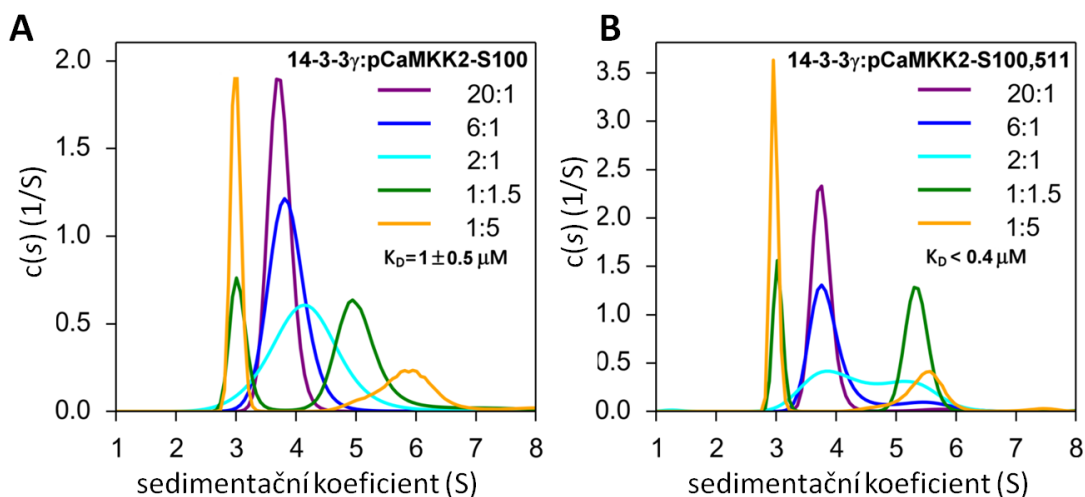
5.3 Interakce proteinu 14-3-3 s katalytickou doménou proteinkinasy CaMKK2 (publikace III)

Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa (CaMKK) je členem rodiny Ca^{2+} /kalmodulin-dependentních proteinkinás (CaMK). U savců byly identifikovány dvě CaMKK isoformy, CaMKK1 a CaMKK2, které jsou obě hojně exprimovány v mozku. Isoforma CaMKK2 je jednou z nejvšestrannějších CaMK, protože se podílí na regulaci široké škály fyziologických procesů, jako například regulace tukové tkáně, glukosové homeostaze, hematopoézy, zánětu či rakoviny (Racioppi a Means, 2012). Obě CaMKK isoformy interagují s několika isoformami proteinu 14-3-3 (především s isoformou γ) a konzervovaný motiv zahrnující pSer⁷⁴ u CaMKK1 (odpovídá pSer¹⁰⁰ u CaMKK2) slouží jako primární 14-3-3 vazebný motiv (Davare *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2008). Kromě tohoto primárního motivu byl u CaMKK identifikován druhý 14-3-3 vazebný motiv zahrnující pSer⁴⁷⁵ u CaMKK1 (odpovídá pSer⁵¹¹ u CaMKK2; Ichimura *et al.*, 2008). Bylo ukázáno, že v případě CaMKK1 má protein 14-3-3 inhibiční vliv na její katalytickou aktivitu (Davare *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2008). Nicméně, molekulární mechanismus této interakce a role proteinu 14-3-3 v regulaci CaMKK2 zatím objasněny nebyly. V této práci byla charakterizována interakce mezi fosforylovanou CaMKK2 (pCaMKK2) a proteinem 14-3-3 γ s použitím metod měření katalytické aktivity, SAXSu a časově rozlišené fluorescence.

5.3.1 CaMKK2 a protein 14-3-3 γ vytvářejí stabilní komplex se stechiometrií 1:2

Vznik komplexu mezi 14-3-3 γ a pCaMKK2-S¹⁰⁰ (konstrukt 93–517, T145A, D330A, S495A, S511A) a mezi 14-3-3 γ a pCaMKK2-S^{100,511} (konstrukt 93–517, T145A, D330A, S495A) byl studován metodou SV AUC. Série $c(s)$ distribucí byly vypočítány na základě změřených sedimentačních profilů částic ve vzorcích komplexu 14-3-3 γ :pCaMKK2 o pěti různých molárních poměrech (20:1, 6:1, 2:1, 2:3 a 1:5, Obr. 5.10). $c(s)$ distribuce ukázaly, že 14-3-3 γ a pCaMKK2-S¹⁰⁰ tvoří komplex s hodnotou sedimentačního koeficientu $s_{(20,w)}$ 6,17 S a s frikčním poměrem f/f_0 1,3; zatímco samotný protein 14-3-3 γ má hodnotu $s_{(20,w)}$ 3,91 a samotná pCaMKK2-S¹⁰⁰ má hodnotu $s_{(20,w)}$ 3,16 S. Hodnota $s_{(20,w)}$ komplexu 14-3-3 γ :pCaMKK2-S¹⁰⁰ odpovídá relativní molekulové hmotnosti ~110 000, což je v dobré shodě s molární stechiometrií 2:1 (teoretická hodnota relativní molekulové hmotnosti komplexu je 105 000). Přímým globálním modelováním Lammových rovnic v programu

SEDPHAT byla odhadnuta hodnota zdánlivé disociační konstanty K_d komplexu 14-3-3 γ :pCaMKK2-S¹⁰⁰ na $1 (\pm 0,5) \mu\text{M}$ za použití reverzibilního vazebného modelu, ve kterém jeden protomer CaMKK2-S¹⁰⁰ interaguje s jedním dimerem 14-3-3 γ , který byl považován za pevný nedisociující dimer.

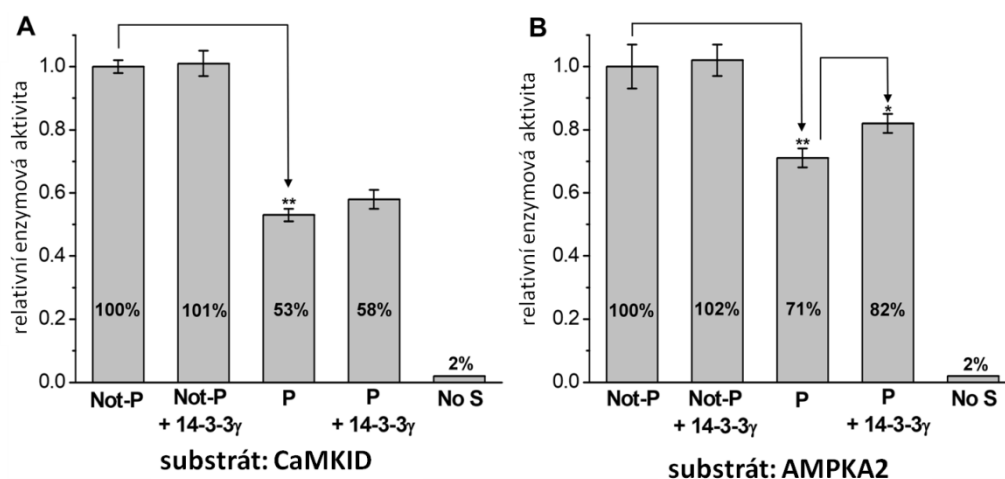


Obr. 5.10 Porovnání sedimentačních analýz pro komplexy 14-3-3 γ :pCaMKK2-S¹⁰⁰ a 14-3-3 γ :pCaMKK2-S^{100,511}. (A) Koncentrační série normalizovaných spojitých distribucí sedimentačních koeficientů komplexu 14-3-3 γ :pCaMKK2-S¹⁰⁰. 14-3-3 γ mělo fixní koncentraci $6 \mu\text{M}$ a koncentrace pCaMKK2-S¹⁰⁰ se pohybovaly v rozsahu $0,3\text{--}30 \mu\text{M}$. Následnou globální analýzou v programu SEDPHAT byla odhadnuta K_d na hodnotu $1 (\pm 0,5) \mu\text{M}$. (B) Koncentrační série normalizovaných spojitých distribucí sedimentačních koeficientů komplexu 14-3-3 γ :pCaMKK2-S^{100,511}. 14-3-3 γ mělo fixní koncentraci $6 \mu\text{M}$ a koncentrace pCaMKK2-S^{100,511} se pohybovaly v rozsahu $0,3\text{--}30 \mu\text{M}$. Následnou globální analýzou v programu SEDPHAT byla odhadnuta K_d na hodnotu $< 0,4 \mu\text{M}$.

SV AUC analýza různých molárních poměrů 14-3-3 γ a pCaMKK2-S^{100,511} odhalila tvorbu komplexu s hodnotou $s_{(20,w)}$ $5,72 \text{ S}$ a frikční poměr f/f_0 $1,4$. Tato hodnota sedimentačního koeficientu odpovídá relativní molekulové hmotnosti $\sim 111\,000$, což je znovu v dobré shodě s molární stechiometrií komplexu 2:1. Přímé modelování SV AUC dat (provedené identicky jako v případě komplexu 14-3-3 γ :pCaMKK2-S¹⁰⁰) odhadlo zdánlivou disociační konstantu K_d na $< 0,4 \mu\text{M}$, což je hodnota nižší než tomu bylo v případě komplexu 14-3-3 γ :pCaMKK2-S¹⁰⁰. To pravděpodobně znamená, že fosforylovaný C-koncový motiv má za následek zvýšení stability komplexu.

5.3.2 Vazba proteinu 14-3-3 nemá přímý inhibiční efekt na katalytickou aktivitu CaMKK2

Předchozí studie ukázaly, že vazba proteinu 14-3-3 inhibuje katalytickou aktivitu CaMKK1 (Davare *et al.*, 2004, Ichimura *et al.*, 1996). Zajímalo nás, jestli budeme pozorovat stejný 14-3-3 inhibiční efekt na katalytickou aktivitu CaMKK2, a tak byla provedena měření katalytické aktivity CaMKK2 WT. Jako specifické substráty byly použity lidské CaMKID D165A a AMPKA2 D157A (katalytická podjednotka AMPK). Podle očekávání, fosforylace CaMKK2 proteinkinasou PKA signifikantně potlačila její katalytickou aktivitu vzhledem k nefosforylované CaMKK2 až o ~50% v přítomnosti substrátu CaMKID a o ~30% v přítomnosti substrátu AMPKA2 (Obr. 5.11).



Obr. 5.11 Katalytická aktivita nefosforylované a fosforylované CaMKK2 v přítomnosti a v nepřítomnosti proteinu 14-3-3γ. Katalytická aktivita byla měřena za použití dvou fyziologických substrátů CaMKK2, CaMKID (katalyticky neaktivní mutant D165A) a AMPKA2 (katalyticky neaktivní mutant D157A). Aktivita byla normalizována vzhledem k nefosforylovanému enzymu v nepřítomnosti 14-3-3γ. Každý vzorek byl změřen 3× a výsledky jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. Specifická aktivita nefosforylované CaMKK2 (100% aktivity) byla pro substrát CaMKID stanovena na hodnotu 940 (± 20) a pro substrát AMPKA2 stanovena na 740 (± 50) nmol substrátu za minutu na mg enzymu. Not-P znamená nefosforylovaná CaMKK2, P znamená fosforylovaná CaMKK2, a No S znamená měření bez přítomnosti substrátu.

Výsledky ukázaly, že přidavek 14-3-3γ nesnížil aktivitu fosforylované CaMKK2, ale naopak, došlo k jejímu mírnému zvýšení. V případě substrátu CaMKID nebyl tento aktivační efekt signifikantní (aktivita byla zvýšena pouze o 5% vzhledem k aktivitě fosforylované CaMKK2), ale v případě substrátu AMPKA2 byla aktivita fosforylované

CaMKK2 zvýšena o 11%, což už byla signifikantní změna. Na základě těchto výsledků lze usoudit, že se role proteinu 14-3-3 v regulaci katalytické aktivity CaMKK1 a CaMKK2 budou pravděpodobně lišit. Podle práce Davare a kol. (Davare *et al.*, 2004) protein 14-3-3 inhibuje aktivitu CaMKK1 hlavně díky inhibici defosforylace fosforylačního místa Thr¹⁰⁸ (odpovídá Thr¹⁴⁵ u CaMKK2), čímž je proteinkinasa CaMKK1 udržována v neaktivním stavu prostřednictvím fosforylace PKA. Proto byla provedena měření časově závislé celkové defosforylace PKA fosforylované CaMKK2 proteinfosfatase typu 1 (PP1) v nepřítomnosti a v přítomnosti 14-3-3 γ (viz Obr. S3, publikace III). Výsledky tohoto experimentu naznačují, že 14-3-3 γ inhibuje aktivitu CaMKK2 nepřímo, prostřednictvím protekce defosforylace inhibičních PKA fosforylačních míst pThr¹⁴⁵ a pSer⁴⁹⁵.

5.3.3 Katalytická doména CaMKK2 v roztoku interaguje s 14-3-3 γ ΔC mimo centrální kanál

Rozptylové křivky pro 14-3-3 γ ΔC, CaMKK2-S¹⁰⁰ a komplexy 14-3-3 γ ΔC:pCaMKK2-S¹⁰⁰ a 14-3-3 γ ΔC:pCaMKK2-S^{100,511} (připraveny v souladu se stechiometrií 2:1) byly měřeny pro různé koncentrace (Tab. 5.5, Obr. 5.12).

Tabulka 5.5: Strukturní parametry CaMKK2 a 14-3-3 γ určené metodou SAXS

Vzorek	c (mg.mL ⁻¹)	R_g (Å) ^a	R_g (Å) ^b	D_{max} (Å)	V_p^c (nm ³)	$M_w^{d,e}$ (kDa)	$M_w^{e,f}$ (kDa)
14-3-3 γ ΔC	3,0	28,7 ± 0,4	28,6 ± 0,4	89	77,8	54 ± 1	49
	1,5	29,0 ± 0,4	29,0 ± 0,4	89	82,8	55 ± 1	52
CaMKK2	2,8	32,6 ± 0,3	32,7 ± 0,3	126	95,6	48 ± 1	60
	2,1	32,1 ± 0,3	32,2 ± 0,3	125	94,0	46 ± 1	59
komplex 14-3-3 γ ΔC: pCaMKK2-S ¹⁰⁰	16,9	42,3 ± 0,6	42,4 ± 0,6	146	160,4	92 ± 1	100
	12,6	42,5 ± 0,6	42,6 ± 0,6	144	163,4	95 ± 1	102
	9,9	42,4 ± 0,6	42,5 ± 0,6	146	161,1	94 ± 1	101
komplex 14-3-3 γ ΔC: pCaMKK2-S ^{100,511}	11,9	39,9 ± 0,7	40,0 ± 0,7	141	164,8	97 ± 1	103
	6,5	39,1 ± 0,6	39,2 ± 0,6	141	159,6	94 ± 1	100

^a Určeno Guinierovou aproximací (Guinier, 1939).

^b Určeno z $P(r)$ funkce pomocí programu GNOM (Svergun, 1992).

^c Porodův objem – vyloučený objem hydratované částice.

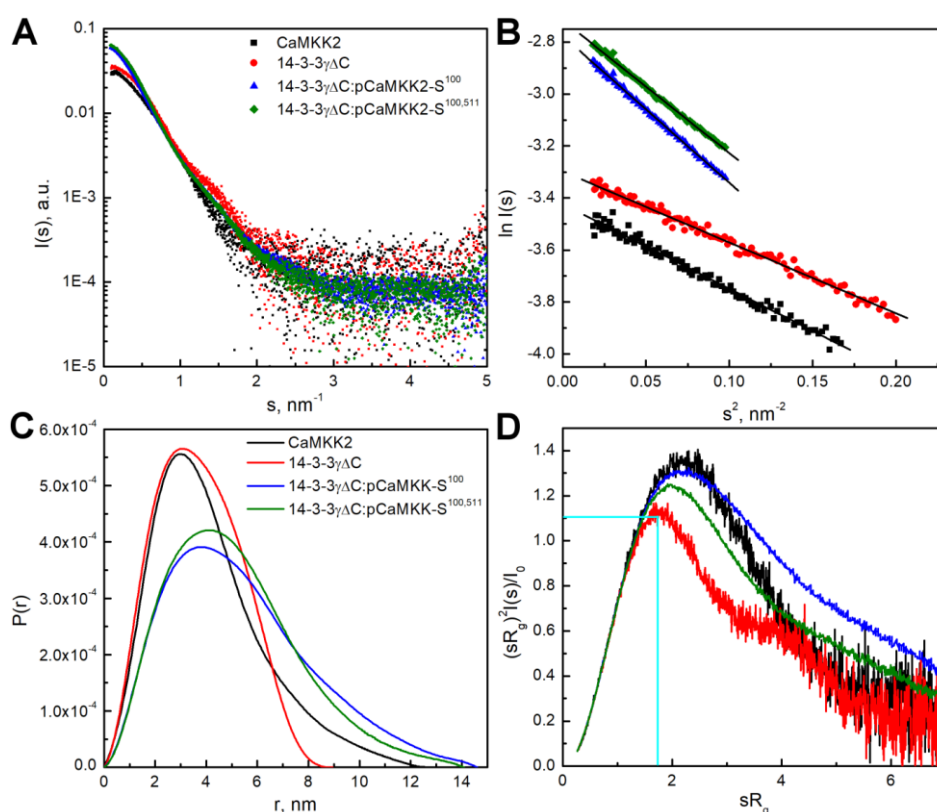
^d Určeno srovnáním počáteční intenzity rozptylu $I(0)$ s referenčním hovězím sérovým albuminem

^e Molekulová váha odhadnuta na základě Porodova objemu ($M_w \approx V_p \times 0.625$) (Petoukhov *et al.*, 2012).

^f Teoretické molekulové hmotnosti jsou pro dimer 14-3-3 γ ΔC 54,3 kDa, monomer CaMKK2 48,0 kDa a pro komplex pCaMKK2:14-3-3 γ ΔC (se stechiometrií 2:1) 102,3 kDa.

Linearita Guinierových výnosů (Obr. 5.12B) a žádné výrazné odchylky od parametrů jako koncentrační závislost počáteční intenzity rozptylu $I(0)$, Porodův objem V_p a gyrační poloměr R_g (Tab. 5.5) vyloučily přítomnost agregátů a potvrdily stabilitu komplexů

v rámci připravené koncentrační škály. Zdánlivé relativní molekulové hmotnosti ($\sim 47\,000$ pro samotnou CaMKK2 a $\sim 54\,000$ pro samotné 14-3-3 $\gamma\Delta C$) odhadnuty na základě $I(0)$ jsou v dobré shodě s jejich teoretickými hodnotami relativních molekulových hmotností ($48\,000$ pro CaMKK2 a $54\,300$ 14-3-3 $\gamma\Delta C$). Zdánlivé relativní molekulové hmotnosti $92\,000$ – $95\,000$ pro komplex 14-3-3 $\gamma\Delta C$:pCaMKK2-S¹⁰⁰ a $94\,000$ – $97\,000$ pro komplex 14-3-3 $\gamma\Delta C$:pCaMKK2-S^{100,511} stejně jako jejich Porodův objem $V_P \sim 160\text{ nm}^3$ dobře odpovídá molární stechiometrii 2:1 ($M_{\text{teor}} = 102\,300$), což potvrzuje výsledky z SV AUC.



Obr. 5.12 SAXS analýza komplexů 14-3-3 γ :pCaMKK2 (A) Intenzita rozptylu jako funkce rozptylového vektoru s ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, viz kap. 4.5). Černá barva představuje data pro samotný protein CaMKK2-S¹⁰⁰, červeně jsou vyznačena data pro samotné 14-3-3 $\gamma\Delta C$, komplex 14-3-3 $\gamma\Delta C$:pCaMKK2-S¹⁰⁰ je znázorněn modrou barvou a komplex 14-3-3 $\gamma\Delta C$:pCaMKK2-S^{100,511} zelenou barvou. (B) Guinierovy výnosy ($\ln I(s)$ proti s^2) odpovídající křivkám z panelu A. (C) Distribuce meziatomových vzdáleností $P(r)$ částic vypočítána z rozptylových křivek pomocí programu GNOM (Svergun, 1992). (D) Bezrozměrné Kratkeho výnosy. Tyrkysovou barvou je vyznačeno maximum v hodnotě 1,104 pro $sR_g = 1,73$; které je charakteristické pro globulární proteiny (Receveur-Brechot, *et al.* 2012).

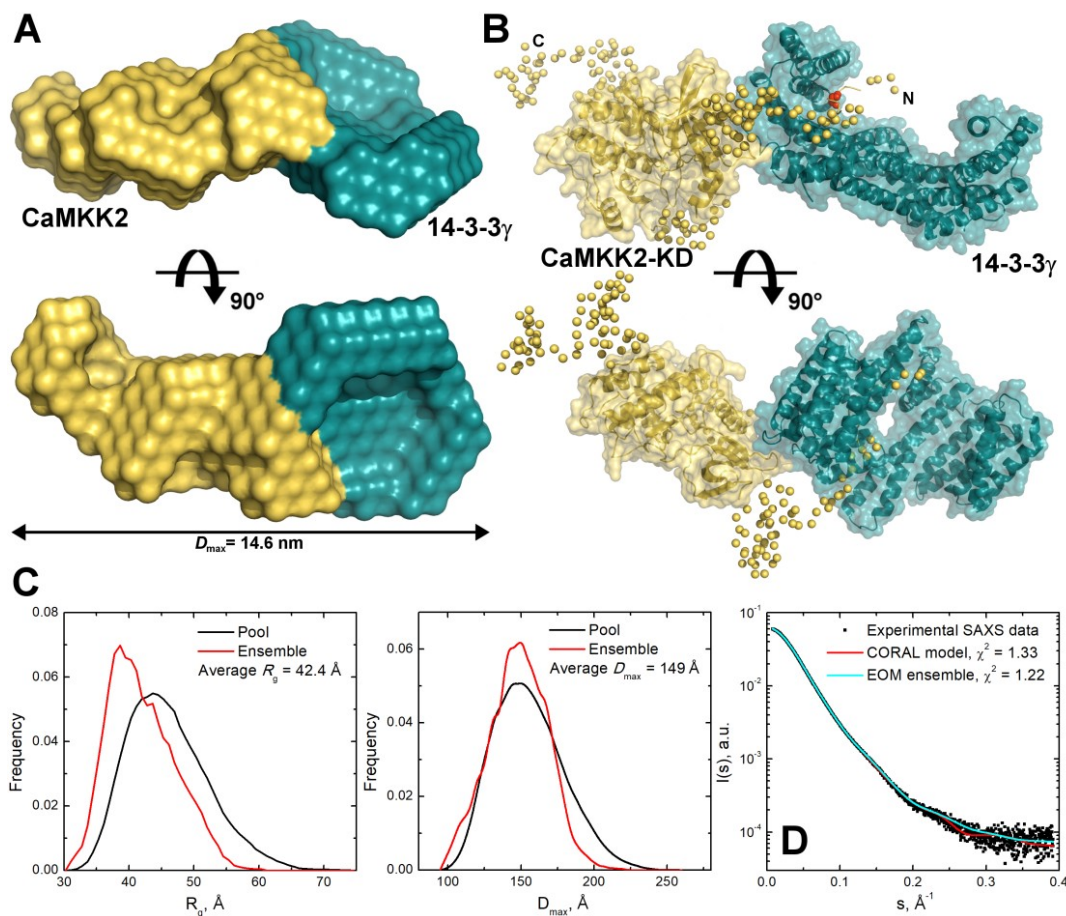
Srovnání vypočítaných distribucí meziatomových vzdáleností $P(r)$ je ukázáno na Obr. 5.12C. Tvary $P(r)$ funkcí pro samotnou CaMKK2 a pro oba komplexy jsou výrazně

asymetrické a také mají větší zastoupení delších meziatomových vzdáleností a vyšší hodnotu maximální intramolekulární vzdálenosti D_{\max} , než v případě samotného proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Na základě tohoto výsledku můžeme říct, že proteinkinasa CaMKK2 a komplexy 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S¹⁰⁰ a 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S^{100,511} mají protáhlejší tvar než dimer 14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Hodnoty R_g a D_{\max} komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S^{100,511} jsou nižší v porovnání s hodnotami R_g a D_{\max} komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S¹⁰⁰, z čeho se dá usoudit, že proteinkinasa CaMKK2, která má fosforylované oba 14-3-3 vazebné motivy, tvoří s proteinem 14-3-3 kompaktnější komplex, než v případě pouze jednoho fosforylovaného 14-3-3 vazebného motivu.

Normalizované Kratkeho výnosy ukázaly, že CaMKK2 a oba komplexy jsou konformačně flexibilnější než samotné 14-3-3 $\gamma\Delta$ C (Obr. 5.12D). SAXS data kompaktních globulárních částic ve formě tohoto výnosu mají maximální hodnotu 1,104 v bodě $sR_g \sim 1,73$ (Receveur-Brechot, *et al.* 2012). Jedině v případě proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C má Kratkeho výnos charakteristický zvonovitý tvar a maximální hodnotu 1,1 při sR_g 1,7 (vyznačeno tyrkysovou barvou na Obr. 5.12D). Srovnání Kratkeho výnosů obou komplexů odhalilo pozvolnější pokles funkce směrem k nule při vyšších hodnotách sR_g a vyšší hodnoty maxim u komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S¹⁰⁰, což naznačuje, že tento komplex je flexibilnější než komplex 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S^{100,511}, pravděpodobně v důsledku nepřítomnosti interakce proteinu 14-3-3 γ s C-koncovým segmentem CaMKK2.

Strukturní modelování na základě SAXS dat bylo provedeno pouze pro komplex 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S¹⁰⁰, kvůli heterogenitě způsobené neúplnou fosforylací C-koncového 14-3-3 vazebného motivu v okolí Ser⁵¹¹ v případě komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S^{100,511} (viz Obr. S2, publikace III). Navíc pravděpodobně komplex 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S¹⁰⁰ lépe reprezentuje fyziologicky relevantní formu, vzhledem k neúplné fosforylaci Ser⁵¹¹ (Matsushita *et al.*, 1999; Okuno *et al.*, 2001, Davare *et al.*, 2004). Abychom určili relativní pozice 14-3-3 a CaMKK2 v rámci komplexu, bylo použito multifázové modelování, z kterého lze získat *ab initio* kuličkový model, který obsahuje dvě fáze reprezentující individuální komponenty v rámci modelu s nízkým rozlišením (Rambo, 2015). S pomocí programu MONSA (Svergun, 1999) bylo vygenerováno dvacet nezávislých modelů, které měly podobné tvary s hodnotou NSD 0,61. NSD (z angl. normalized spatial discrepancy) udává míru podobnosti mezi sadami bodů v prostoru. Výsledný model (Obr. 5.13A), který měl nejnižší NSD, byl v dobré shodě s experimentálními SAXS daty. Vypočítaná molekulová obálka má asymetrický tvar,

přičemž CaMKK2 představovala větší fázi. Fáze CaMKK2 se vyskytovala na straně dimeru proteinu 14-3-3 mimo centrální kanál.



Obr. 5.13 Strukturní modelování komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2-S¹⁰⁰ na základě dat ze SAXS.

(A) Nejtypičtější multifázová rekonstrukce komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2-S¹⁰⁰, ve které je fáze 14-3-3 znázorněna modrou a fáze CaMKK2 je znázorněna žlutou barvou. (B) Typická konformace komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2-S¹⁰⁰ získaná programem CORAL s použitím krystalových struktur 14-3-3γΔC (PDB kód: 2B05) a katalytické domény CaMKK2 (PDB kód: 2ZV2; Kukimoto-Niino *et al.*, 2011). Nestrukturované segmenty chybějící v krystalové struktuře byly modelovány jako řetěz sfér o velikosti odpovídající průměrné aminokyselině. Serinový zbytek v sekvenci CaMKK2 Ser¹⁰⁰ je znázorněn červenou barvou. (C) Distribuce hodnot R_g a D_{max} pro konformace komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2-S¹⁰⁰ z počátečního (černá křivka) a výsledného (červená křivka) souboru konformerů v programu EOM (Tria *et al.*, 2015). (D) Experimentální rozptylová křivka komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2-S¹⁰⁰ (černá barva) superponovaná s vypočtenou křivkou modelu CORAL (červená barva) a vybraného souboru konformerů v programu EOM (modrá barva).

Pro komplex 14-3-3γΔC:pCaMKK2-S¹⁰⁰ bylo poté provedeno modelování „rigid-body“ pomocí programu CORAL (Petoukhov *et al.*, 2012) a pomocí krystalových struktur 14-3-3γΔC (PDB kód: 2B05) a katalytické domény CaMKK2 (PDB kód: 2ZV2;

Kukimoto-Niino *et al.*, 2011). N-koncový 14-3-3 vazebný motiv CaMKK2 byl umístěn do vazebného místa jednoho z protomerů dimeru 14-3-3 γ a nestrukturované segmenty chybějící v krystalové struktuře katalytické domény CaMKK2 byly modelovány jako řetěz sfér o velikosti odpovídající průměrné aminokyselině (tzv. „dummy“ aminokyselinové zbytky). Výsledný CORAL model byl ve shodě s experimentálními SAXS daty s hodnotou $\chi^2 = 1,33$. CORAL model má asymetrický tvar, ve kterém je katalytická doména CaMKK2 umístěna mimo centrální kanál dimeru 14-3-3 γ (Obr. 5.13B,D). Tento model předpokládá, že pCaMKK2-S¹⁰⁰ interaguje s 14-3-3 γ nejen prostřednictvím fosforylovaného N-koncového 14-3-3 vazebného motivu, ale také pomocí přímého kontaktu mezi povrchy katalytické domény CaMKK2 a 14-3-3. Nejedná se tedy o plně rozvolněný stav, ve kterém je molekula CaMKK2 přichycena k dimeru 14-3-3 pouze přes jeden fosforylovaný vazebný motiv. Navíc přítomnost dalších kontaktů mezi 14-3-3 γ a pCaMKK2-S¹⁰⁰ je podpořena zjištěnou vazebnou afinitou $K_d \sim 1 \mu\text{M}$ (Obr. 5.10A), která je značně vyšší než afinita 14-3-3 γ k syntetickému fosfopeptidu obsahujícímu pouze N-koncový 14-3-3 vazebný motiv, který váže 14-3-3 γ s $K_d = 9 \mu\text{M}$ (viz Obr. S6, publikace III).

14-3-3 vazebný motiv a katalytická doména v molekule CaMKK2 jsou od sebe odděleny segmentem obsahujícím 60 aminokyselinových zbytků. Teoretická predikce neuspořádanosti (Obr. S4, publikace III) naznačila, že se pravděpodobně jedná o nestrukturovaný segment, což by mohlo způsobovat konformační heterogenitu komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$:pCaMKK2-S¹⁰⁰. Přítomnost konformační heterogenity komplexu byla navíc indikována bezrozměrným Kratkeho výnosem SAXS dat (Obr. 5.12D). Proto byla struktura komplexu modelována také jako soubor konformerů s použitím programu EOM (Tria *et al.*, 2015). Dimer 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$, 14-3-3 vazebný motiv a katalytická doména CaMKK2 byly považovány za rigidní struktury a flexibilní N- a C-koncové segmenty CaMKK2 byly modelovány jako řetězce tzv. „dummy“ aminokyselinových zbytků. Nejdříve byl vygenerován počáteční soubor 10 000 konformerů komplexu a následně byl použit genetický algoritmus k výběru malého souboru konformerů, který byl v nejlepší shodě s experimentálními SAXS daty. Teoretická SAXS křivka vypočítaná na základě výsledného souboru konformerů se s experimentálními SAXS daty shodovala s hodnotou $\chi^2 = 1,22$ (Obr. 5.13D). Distribuce R_g a D_{max} vypočítané pro počáteční a výsledný soubor konformerů jsou zobrazeny na Obr. 5.13C. Porovnání distribucí R_g počátečního a výsledného souboru konformerů ukázalo, že vybraný výsledný soubor obsahuje kompaktnější struktury s nižšími hodnotami R_g . Průměrné hodnoty $R_g = 42,4 \text{ \AA}$ a $D_{\text{max}} =$

149 Å jsou v souladu s hodnotami vypočítanými z experimentálních rozptylových křivek (Tab. 5.5). Navíc distribuce R_g a D_{max} výsledného souboru konformerů jsou užší v porovnání s distribucemi počátečního souboru konformerů. To také naznačuje, že výsledný soubor konformerů nezahrnuje plně rozvolněné (natažené) konformery komplexu, pravděpodobně z důvodu existence interakcí mezi 14-3-3 γ AC a katalytickou doménou CaMKK2. Tyto výsledky jsou ve shodě s modely získanými pomocí programů MONSA a CORAL.

5.3.4 Diskuse

Hlavním cílem této práce byla charakterizace interakce mezi proteinem 14-3-3 a CaMKK2. Proteiny 14-3-3 regulují funkce mnoha enzymů za pomoci různých mechanismů. Například, serotonin N-acetyltransferasa a neutrální trehalasa jsou aktivovány pomocí strukturní modulace jejich aktivního centra proteinem 14-3-3 (Alblova *et al.*, 2017; Obsil *et al.*, 2001). V případě fosforylované tryptofan hydroxylasy, vazba 14-3-3 zpomaluje defosforylaci klíčových regulačních fosforylačních motivů (Banik *et al.*, 1997). Další mechanismy jsou založeny na regulaci subcelulární lokalizace (Kumagai *et al.*, 1999) a na stabilizaci terciární struktury nebo kvartérní struktury navázaného enzymu (Ottman *et al.*, 2007). Mezi enzymy, které jsou regulovány proteinem 14-3-3 patří velmi často také proteinkinasy (Tinti *et al.*, 2014), i když mechanismy těchto dějů nejsou zcela dobře objasněny, hlavně v důsledku nedostatku strukturních dat. Předěšlé studie o fosforylované CaMKK1 ukázaly, že vazba 14-3-3 potlačuje její katalytickou aktivitu (Davare *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2008). Překvapivě, měření enzymové aktivity ukázalo, že aktivita fosforylované CaMKK2 není přítomností proteinu 14-3-3 γ inhibována, ale má spíše mírně aktivační efekt (Obr. 5.11). To znamená, že CaMKK isoformy se budou pravděpodobně lišit v jejich regulaci zprostředkované proteinem 14-3-3, možná kvůli rozdílům v jejich biochemických vlastnostech (Tokumitsu *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 1998). Výsledky SAXS analýzy napověděly, že komplex 14-3-3 γ AC:pCaMKK2-S¹⁰⁰ má protáhlou a flexibilní konformaci, ve které katalytická doména CaMKK přímo interaguje s povrchem dimeru 14-3-3 γ mimo centrální kanál (Obr. 5.13A,B). Interakce mezi katalytickou doménou pCaMKK2-S¹⁰⁰ a 14-3-3 γ AC byla také vyšetřena metodou vytvoření souboru konformací (Obr. 5.13C), ze které vyplynulo, že komplex 14-3-3 γ AC:pCaMKK2-S¹⁰⁰ není rozvolněný do takové míry, do jaké by povolily spojovací segmenty. Navíc výsledky časově rozlišené fluorescenční spektroskopie a vazebná afinita

pCaMKK2-S¹⁰⁰ k proteinu 14-3-3 γ (která byla výrazně vyšší, než vazebná afinita syntetického fosfopeptidu, který obsahuje pouze N-koncový 14-3-3 vazebný motiv) (Obr. S6, publikace III) dále svědčí ve prospěch existence kontaktů mezi 14-3-3 γ a katalytickou doménou CaMKK2. Ačkoliv 14-3-3 vazebný motiv v okolí Ser⁵¹¹ na C-konci CaMKK2 není plně fosforylován *in vivo* (Matsushita *et al.*, 1999; Okuno *et al.*, 2001, Davare *et al.*, 2004), přítomnost fosforylace tohoto motivu zvýšila celkovou stabilitu komplexu a omezila jeho konformační flexibilitu (Obr. 5.10B, 5.12D) nejpravděpodobněji v důsledku imobilizace C-koncového nestrukturovaného segmentu (C-koncový motiv je ukotven v druhém vazebném místě dimeru 14-3-3 γ). Interakce mezi 14-3-3 a katalytickou doménou CaMKK2 může být důvodem pro pozorované změny v katalytické aktivitě CaMKK2 (Obr. 5.11). Je možné, že vazba proteinu 14-3-3 γ ovlivňuje konformaci aktivního místa CaMKK2 a jeho přístupnost. Další z možností, která se nabízí je, že vazba proteinu 14-3-3 γ ovlivňuje interakci mezi katalytickou doménou a regulačními N- nebo C-koncovými doménami CaMKK2, které jsou od katalytické domény odděleny flexibilními segmenty. Aktivita CaMKK1 je inhibována fosforylací zbytku Thr¹⁰⁸ (analogická pozice u CaMKK2 je Thr¹⁴⁵; Wayman *et al.*, 1997; Kitani *et al.*, 2001). Navíc nedávná studie (Nakanishi *et al.*, 2017) ukázala, že fosforylace tohoto threoninového zbytku proteinem AMPK inhibuje autonomní aktivitu potkaní CaMKK2 bez žádného výrazného vlivu na aktivitu závislou od přítomnosti komplexu Ca²⁺/kaldmodulin. Tento threoninový zbytek je v sekvenci umístěn v nestrukturované oblasti mezi N-koncovým 14-3-3 vazebným motivem a katalytickou doménou (Obr. 2.10A; Wayman *et al.*, 1997; Kitani *et al.*, 2001). V této oblasti obsahuje CaMKK2 také zbytky Ser¹²⁹, Ser¹³³ a Ser¹³⁷, které jsou fosforylované cyklin-dependentní kinasou 5 a glykogensynthasa kinasou 3, které se účastní regulace autonomní aktivity CaMKK2 (Green *et al.*, 2011).

5.3.5 Shrnutí výsledků z publikace III

V této práci bylo zjištěno, že protein 14-3-3 neinhibuje katalytickou aktivitu fosforylované CaMKK2 přímo, ale nepřímo prostřednictvím protekce defosforylace inhibičních aminokyselinových zbytků pThr¹⁴⁵ a pSer⁴⁹⁵. Strukturní analýza odhalila, že komplex 14-3-3 γ Δ C:pCaMKK2 je flexibilní, a že CaMKK2 se vyskytuje mimo centrální kanál dimeru 14-3-3 γ . Navíc bylo zjištěno, že protein 14-3-3 γ pravděpodobně přímo interaguje s proteinkinasou CaMKK2 a ovlivňuje strukturu jejího povrchu mimo 14-3-3 vazebné motivy, mezi nimi například i katalytickou doménu a oblast obsahující Thr¹⁴⁵.

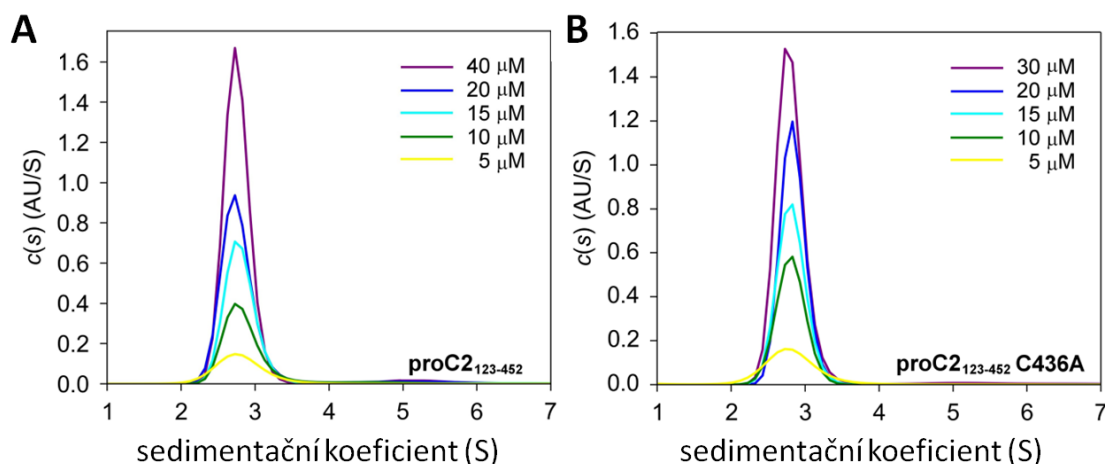
5.4 Vazba lidské prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3 vyžaduje dva fosforylační motivy (publikace IV)

Kaspasy jsou rodina vnitrobuněčných cystein-dependentních, aspartátových proteas, které hrají klíčovou roli v signalizaci při apoptose nebo zánětlivé odpovědi a prokaspasy jsou jejich neaktivní zymogeny (Pop a Salvesen, 2009). Bylo ukázáno, že kaspasa-2 je důležitým spojovacím článkem mezi buněčným metabolismem a apoptosou (Nutt *et al.*, 2005; Krumschanbel *et al.*, 2009). V oocytech obojživelníka *Xenopus laevis* bylo ukázáno, že vysoká hladina NADPH vytvořena pentosafosfátovým cyklem spouští fosforylaci prokaspasy-2 na serinovém zbytku Ser¹³⁵ Ca²⁺/kalmodulin-dependentní proteinkinasou II. Po tomto ději následuje vazba 14-3-3, která blokuje aktivaci prokaspasy-2, čímž také blokuje apoptosu (Nutt *et al.*, 2005; Nutt *et al.*, 2009). Při poklesu koncentrace NADPH, je prokaspasa-2 defosforylována, 14-3-3 disociuje a poté dochází k aktivaci proteasové aktivity a apoptose. Pro lidskou prokaspasu-2 bylo bioinformatickou analýzou (Tinti *et al.*, 2014) předpověděno, že motivy kolem fosforylovaných zbytků Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ jsou 14-3-3 vazebnými motivy, nicméně tato hypotéza dosud nebyla ověřena. V této práci byla připravena neaktivní forma lidské prokaspasy-2 a byla studována její interakce s proteinem 14-3-3 ζ .

5.4.1 Fosforylovaná prokaspasa-2 je v roztoku monomerní

V literatuře (Baliga *et al.*, 2004) bylo popsáno, že prokaspasa-2 může v roztoku vytvářet dimery, a to i v nepřítomnosti substrátů nebo inhibitorů. Ačkoliv je naše rekombinantní prokaspasa-2 (proC2) zkrácena o tzv. prodoménu (CARD), která je pro dimerizaci klíčová (Obr. 2.11A, kap. 4.2.10), stále by mohla dimerizovat prostřednictvím interakcí mezi proteasovými doménami. Dále je z literatury známo (Schweizer *et al.*, 2003), že dimerní forma proC2 může být stabilizována tvorbou disulfidického můstku na cysteinovém zbytku Cys⁴³⁶. Proto byl vedle proC2 připraven mutant proC2 C436A. Metoda SV AUC byla použita k porovnání sedimentačních vlastností těchto dvou proteinů a k určení jejich oligomerního stavu v roztoku. Série $c(s)$ distribucí byly vypočítány na základě měření sedimentační rychlosti částic ve vzorcích proC2 a proC2 C436A (Obr. 5.14). Pozorovaná hodnota sedimentačních koeficientů $s_{(20,w)}$ pro oba studované proteiny činila 2,9 S. V kombinaci s hodnotou frikčního poměru f/f_0 tato hodnota odpovídá relativní molekulové hmotnosti přibližně 39 000, což naznačuje, že oba studované proteiny jsou

v roztoku monomerní (teoretická relativní molekulová hmotnost proC2 je 38 200). Z tohoto důvodu byly všechny další experimenty v této publikaci prováděny s původním konstruktem proC2.



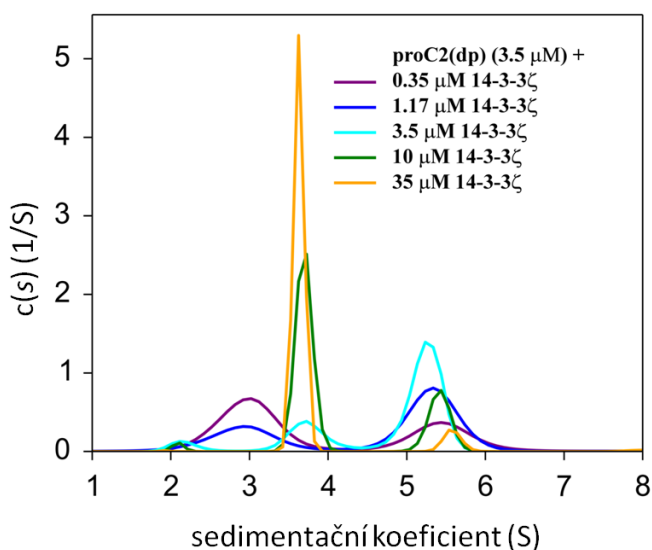
Obr. 5.14 Porovnání sedimentačních vlastností proC2(dp) WT s proC2(dp) C436A. (A) Série spojitých distribucí sedimentačních koeficientů proC2 při různých koncentracích. (B) Série spojitých distribucí sedimentačních koeficientů proC2 C436A, při různých koncentracích.

5.4.2 Fosforylovaná prokaspasa-2 a 14-3-3ζ tvoří stabilní komplex se stechiometrií 1:2

Pro studium interakce mezi fosforylovanou prokaspasou-2 na obou předpověděných 14-3-3 vazebných motivech (proC2(dp)) a proteinem 14-3-3ζ byla použita metoda SV AUC. Série $c(s)$ distribucí byly vypočítány na základě měření sedimentační rychlosti částic ve vzorcích komplexu proC2(dp):14-3-3ζ o pěti různých molárních poměrech (1:10, 1:3, 1:1, 3:1 a 10:1, Obr. 5.15). Pozorovaná hodnota sedimentačního koeficientu $s_{(20,w)}$ pro studovaný komplex činila 5,8 S (na základě $c(s)$ distribuce směsi s nejvyšším molárním poměrem 14-3-3ζ k proC2(dp), oranžová křivka na Obr. 5.15), která v kombinaci s hodnotou frikčního poměru f/f_0 odpovídá relativní molekulové hmotnosti přibližně 111 000, což nejlépe odpovídá molární stechiometrii 1:2 (monomer proC2(dp) interagující s dimerem 14-3-3ζ, teoretická relativní molekulová hmotnost 94 100).

Přímým globálním modelováním Lammových rovnic v programu SEDPHAT (Schuck, 2003) byla odhadnuta hodnota K_d komplexu proC2(dp):14-3-3ζ na 230 (\pm 30) nM za použití reverzibilního vazebného modelu, ve kterém jeden protomer proC2(dp) interaguje s jedním dimerem 14-3-3ζ a protein 14-3-3ζ byl považován za pevný nedisociující dimer. Vazba proteasy proC2(dp) k 14-3-3ζ je mnohem silnější v porovnání s vazbou syntetických fosfopeptidů k proteinu 14-3-3ζ (viz Obr. 2B, publikace IV), což naznačuje,

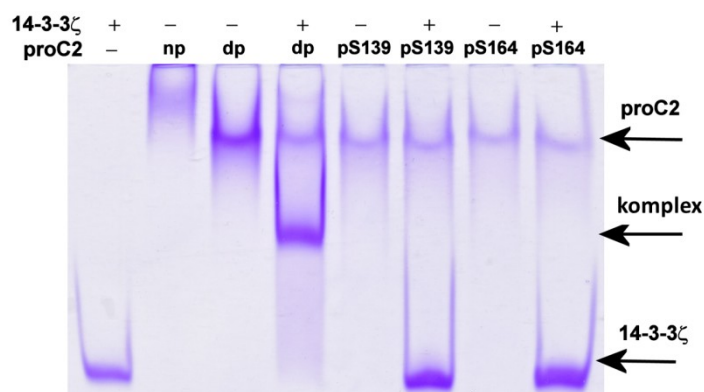
že se na vazbě 14-3-3 ζ k proC2(dp) pravděpodobně kromě 14-3-3 vazebných motivů podílí také další kontakty těchto vazebných partnerů.



Obr. 5.15 Série normalizovaných spojitých distribucí sedimentačních koeficientů komplexu proC2(dp):14-3-3 ζ . proC2(dp) je zde 3,5 μ M a koncentrace dimeru 14-3-3 ζ se pohybovaly v rozsahu 0,35–35 μ M. Následnou globální analýzou v programu SEDPHAT byla odhadnuta zdánlivá disociační konstanta na hodnotu 230 ± 30 nM.

5.4.3 Vazba 14-3-3 ζ k prokaspase-2 vyžaduje současnou fosforylaci dvou 14-3-3 vazebných motivů

K objasnění důležitosti jednotlivých 14-3-3 vazebných motivů u proC2 byly připraveny dva mutanty proC2 obsahující vždy pouze jeden ze 14-3-3 vazebných motivů (buď Ser¹³⁹ nebo Ser¹⁶⁴). Jejich interakce s proteinem 14-3-3 ζ byly poté vyhodnoceny metodou nativní TBE-PAGE (Obr. 5.16). Komplex mezi fosforylovanou proC2 a proteinem 14-3-3 ζ byl vytvořen jedině v případě, kdy jsou v molekule proC2 přítomny oba 14-3-3 vazebné motivy. To znamená, že přítomnost pouze jednoho 14-3-3 vazebného motivu v molekule proC2 není dostačující k vytvoření stabilního komplexu s 14-3-3 ζ . Tento experiment byl proveden Mgr. Danou Kalábovou z Laboratoře strukturní biologie signálních proteinů Akademie věd ČR.



Obr. 5.16 12% gel po nativní elektroforéze srovnávající vazebné afinity fosforylovaných variant proC2 k 14-3-3ζ. np znamená nefosforylovaná proC2, dp znamená fosforylovaná proC2(dp), pS139 znamená proC2 fosforylovaná pouze na Ser¹³⁹, pS164 znamená proC2 fosforylovaná pouze na Ser¹⁶⁴. Proteinu 14-3-3ζ bylo v každé jamce nanášeno 240 pmol a variant proC2 bylo v každé jamce nanášeno 120 pmol. Komplex je vytvořen jedině v případě varianty proC2(dp).

5.4.4 Diskuse

Získaná data potvrdila bioinformatickou predikci (Tinti *et al.*, 2014) a naznačují, že oba fosforylační motivy proC2 (Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴) se účastní tvorby komplexu mezi proC2 a 14-3-3ζ. Navíc vznik stabilního komplexu mezi námi připravenou rekombinantní proC2 (123-452) a 14-3-3ζ byl pozorován jedině v případě, kdy byly fosforylovány oba motivy současně (Obr. 5.16). Velký rozdíl ve vazebných afinitách mezi syntetickými peptidy obsahujícími motivy pSer¹³⁹ a pSer¹⁶⁴ (viz Obr. 2B, publikace IV) naznačuje, že motiv obsahující pSer¹³⁹ pravděpodobně funguje jako primární vysokoafinitní místo, zatímco motiv obsahující pSer¹⁶⁴ hraje roli sekundárního nízkoafinitního místa, jehož přítomnost je ale také vyžadována pro plnou biologickou aktivitu (Yaffe, 2002). Navíc vazba dvakrát fosforylované proC2(dp) k proteinu 14-3-3ζ byla výrazně silnější ($K_d = 230 \pm 30$ nM, Obr. 2.15) než vazba syntetických fosfopeptidů k proteinu 14-3-3ζ (afinity v mikromolární oblasti, viz Obr. 2B, publikace IV). Tyto výsledky naznačují, že se vazby proC2 s proteinem 14-3-3ζ kromě samotných fosforylačních motivů budou pravděpodobně zúčastňovat také další nekovalentní interakce mezi povrchy těchto vazebných partnerů. Tento jev byl pozorován už dříve také pro další vazebné partnery proteinu 14-3-3, jako například AANAT (Obsil *et al.*, 2011), neutrální trehalasu I (Alblova *et al.*, 2017) nebo lidský malý Heat shock protein HSPB6 (Sluchanko *et al.*, 2017).

5.4.5 Shrnutí výsledků z publikace IV

Výsledky této publikace naznačují, že pro vazbu prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3 ζ je potřebná současná fosforylace dvou 14-3-3 vazebných motivů. Bylo ukázáno, že dvounásobně fosforylována prokaspasa-2 a dimer proteinu 14-3-3 ζ tvoří stabilní komplex s molární stechiometrií 1:2 a zdánlivá disociační konstanta tohoto komplexu leží v nanomolární oblasti.

6. Závěr

Hlavním cílem této disertační práce bylo studium regulace dvou proteinkinasy, ASK1 a CaMKK2, a jedné proteolytické kaspasy-2 v závislosti na interakcích s jejich vazebnými partnery, proteinem 14-3-3 a thioredoxinem. Věnovala jsem se zejména přípravě proteinů (rekombinantní příprava proteinů a bodová mutagenese), biofyzikálnímu popisu interakcí (analytická ultracentrifugace, měření enzymové aktivity) a pochopení strukturní podstaty regulace studovaných komplexů (pomocí metod SAXS, NMR a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie). Bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Regulace funkce proteinkinasy ASK1 proteinem 14-3-3 ζ

- Katalytická doména ASK1 tvoří s proteinem 14-3-3 ζ komplex s vazebnou stechiometrií 2:2, kde jeden dimer 14-3-3 ζ je asociován s jedním dimerem ASK1-KD.
- Vazba proteinu 14-3-3 ζ snižuje katalytickou aktivitu ASK1-KD až o 40%.
- SAXS analýza potvrdila vazebnou stechiometrii 2:2 komplexu pASK1-KD:14-3-3 $\zeta\Delta C$ a navíc ukázala, že tvar tohoto komplexu je protáhlý a asymetrický.
- Strukturní model, který byl vytvořen na základě SAXS dat a krystalových struktur jednotlivých proteinů ukázal, že komplex pASK1-KD:14-3-3 $\zeta\Delta C$ je v roztoku konformačně heterogenní.
- Strukturní analýza společně s daty ^{31}P NMR a měření časově rozlišené tryptofanové fluorescence ukázaly, že protein 14-3-3 ζ interaguje s katalytickou doménou ASK1 v těsné blízkosti jejího aktivního místa a ovlivňuje strukturu této oblasti. To by mohlo vysvětlit inhibiční efekt vazby 14-3-3 na kinasovou aktivitu ASK1.

2. Mechanismus disociace komplexu ASK1-TBD:TRX1

- Tvorba cystinových můstků ovlivňuje oblasti ASK1-TBD, které jsou přímo zapojeny nebo jsou důležité pro vazbu TRX1.
- Cysteinový zbytek Cys³² redukovaného TRX1 je zodpovědný za jeho vysokou vazebnou afinitu k ASK1-TBD.
- Tvorba cystinového můstku mezi Cys³² a Cys³⁵ je hlavním faktorem, který je zodpovědný, za disociaci komplexu ASK1-TBD:TRX1 při oxidaci.

- V molekule ASK1-TBD je Cys²⁵⁰ jediným cysteinovým zbytkem, jehož mutace má zásadní vliv na interakci s TRX1.

3. Regulace funkce proteinkinasy CaMKK2 proteinem 14-3-3 γ

- Proteinkinasa CaMKK2 tvoří s proteinem 14-3-3 γ stabilní komplex s vazebnou stechiometrií 1:2, kde je jeden dimer proteinu 14-3-3 asociován s jedním protomerem CaMKK2.
- Vazba proteinu 14-3-3 γ má na katalytickou aktivitu CaMKK2 mírně aktivační efekt.
- SAXS analýza potvrdila vazebnou stechiometrii komplexu CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta C$ 1:2 a navíc napověděla, že komplex je flexibilní a asymetrický.
- Strukturní model, který byl vytvořen na základě SAXS dat a krystalových struktur jednotlivých proteinů odhalil, že se katalytická doména CaMKK2 vyskytuje mimo centrální kanál dimeru 14-3-3 γ . Protein 14-3-3 γ s touto doménou přímo interaguje, ale tyto interakce nemají velký vliv na její strukturu. Inhibiční efekt vazby 14-3-3 je tedy spíše založen na inhibici defosforylace inhibičních fosforylačních míst pThr¹⁴⁵ a pSer⁴⁹⁵.

4. Interakce lidské prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3

- Vazba lidské prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3 vyžaduje dva fosforylované 14-3-3 vazebné motivy.
- Fosforylována prokaspasa-2 a dimer proteinu 14-3-3 ζ tvoří stabilní komplex s molární stechiometrií 1:2 a zdánlivá disociační konstanta tohoto komplexu leží v nanomolární oblasti.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Adams, J. A. (2001). *Chem. Rev.* 101, 2271–2290.
- Agarwal-Mawal, A., Qureshi, H. Y., Cafferty, P. W., Yuan, Z., Han, D., Lin, R. & Paudel H. K. (2003). *J. Biol. Chem.* 278, 12722–12728.
- Aitken, A., Collinge, D. B., van Heusden, B. P. H., Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G. & Soll, J. (1992). *Trends Biochem. Sci.* 17, 498–501.
- Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J. & Patel, Y. (1995). *J. Biol. Chem.* 270, 5706–5709.
- Alblova, M., Smidova, A., Docekal, V., Vesely, J., Herman, P., Obsilova, V. & Obsil, T. (2017). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E9811–E9820.
- Anderson, K. A., Means, R. L., Huang, Q. H., Kemp, B. E., Goldstein, E. G., Selbert, M. A., Edelman, A. M., Freneau, R. T. & Means, A. R. (1998). *J. Biol. Chem.* 273, 31880–31889.
- Anderson, K. A., Ribar, T. J., Lin, F., Noeldner, P. K., Green, M. F., Muehlbauer, M. J., Witters, L. A., Kemp, B. E. & Means, A. R. (2008). *Cell Metab.* 7, 377–388.
- Baliga, B. C., Read, S. H. & Kumar, S. (2004). *Cell Death Differ.* 11, 1234–1241.
- Banik, U., Wang, G. A., Wagner, P. D. & Kaufman, S. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 26219–26225.
- Bergeron, L., Perez, G.I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K.E., Flaws, J.A., Salter, J.C., Hara, H., Moskowitz, M. A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L. & Yuan J. (1998). *Genes Dev.* 12, 1304–1314.
- Bernadó, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V., Blackledge, M. & Svergun, D. I. (2007). *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5656–5664.
- Bock, J. L. & Sheard, B. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 24–30.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. & Greenberg, M. E. (1999). *Cell* 96, 857–868.
- Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Müller, S., Sobott, F., Parker, S. A., Zhang, H., Min, W., Turk, B. E. & Knapp, S. (2007). *Struct. Lond. Engl.* 1993. 15, 1215–1226.
- Campbell, J. K., Gurung, R., Romero, S., Speed, C.J., Andrews, R. K., Berndt, M. C. & Mitchell, C. A. (1997). *Biochemistry* 36, 15363–15370.
- Carter, L., Kim, S. J., Schneidman-Duhovny, D., Stöhr, J., Poncet-Montange, G., Weiss, T. M., Tsuruta, H., Prusiner, S. B. & Sali, A. (2015). *Biophys. J.* 109, 793–805.

- Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K. & Tsuruo, T. (1999). *Oncogene* 18, 173–180.
- Cheng, Z., Zhang, J., Ballou, D. P. & Williams, C. H. (2011). *Chem. Rev.* 111, 5768–5783.
- Cockrell, L. M., Puckett, M. C., Goldman, E. H., Khuri, F. R. & Fu, H. (2010). *Oncogene* 29, 822–830.
- Cohen, P. (2002). *Nat. Cell Biol.* 4, E127–E130.
- Cohen, P. (2002). *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 309–315.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004). *Cell* 116, 205–219.
- Davare, M. A., Saneyoshi, T., Guire, E. S., Nygaard, S. C. & Soderling, T. R. (2004). *J. Biol. Chem.* 279, 52191–52199.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. (2007). *Oncogene* 26, 3279–3290.
- Duan, H. & Dixit, V. M. (1997). *Nature* 385, 86–89.
- Durand, D., Cannella, D., Dubosclard, V., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P. & Fieschi, F. (2006). *Biochemistry* 45, 7185–7193.
- Edelman, A. M., Mitchelhill, K. I., Selbert, M. A., Anderson, K. A., Hook, S. S., Stapleton, D., Goldstein, E. G., Means, A. R. & Kemp, B. E. (1996). *J. Biol. Chem.* 271, 10806–10810.
- Ellis, R. E., Yuan, J. Y., & Horvitz, H. R. (1991). *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663–698.
- Federspiel, J. D., Codreanu, S. G., Palubinsky, A. M., Winland, A. J., Betanzos, C. M., McLaughlin, B. & Liebler, D. C. (2016). *Mol. Cell. Proteomics* 15, 1947–1961.
- Forman-Kay, J. D., Clore, G. M., Stahl, S. J., and Gronenborn, A. M. (1992). *J. Biomol. NMR* 2, 431–445.
- Franke, D. & Svergun, D. I. (2009). *J. Appl. Crystallogr.* 42, 342–346.
- Freeman, A. K. & Morrison, D. K. (2011). *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 681–687.
- Fu, H., Coburn, J. & Collier, R. J. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 2320–2324.
- Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K. & Ichijo, H. (2007). *Mol. Cell Biol.* 27, 8152–8163.
- Fujisawa, T., Takahashi, M., Tsukamoto, Y., Yamaguchi, N., Nakoji, M., Endo, M., Kodaira, H., Hayashi, Y., Nishitoh, H., Naguro, I., Homma, K. & Ichijo, H. (2016). *Hum. Mol. Genet.* 25, 245–253.

- Ganguly, S., Gastel, J. A., Weller, J. L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M. A. A., Coon, S. L., Hickman, A. B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J. A. & Klein, D. C. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 8083–8088.
- Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpaux, B. & Klein, D. C. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 1222–1227.
- Gardino, A. K. & Yaffe, M. B. (2011). *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 688–695.
- Goldman, E. H., Chen, L. & Fu, H. (2004). *J. Biol. Chem.* 279, 10442–10449.
- Graves, L. M., Duncan, J. S., Whittle, M. C. & Johnson, G. L. (2013). *Biochem. J.* 450, 1–8.
- Green, M. F., Scott, J. W., Steel, R., Oakhill, J. S., Kemp, B. E. & Means, A. R. (2011). *J. Biol. Chem.* 286, 28066–28079.
- Green, S. A. & Bronner, M. E. (2013). *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 95–100.
- Guinier, A. (1939). *Ann. Phys.* 11, 161–237.
- Hanschmann, E. M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C. & Lillig, C. H. (2013). *Antioxid. Redox Signa l.* 19, 1539–1605.
- Haribabu, B., Hook, S. S., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Tomhave, E. D., Edelman, A. M., Snyderman, R. & Means, A. R. (1995). *EMBO J.* 14, 3679–3686.
- Hashemy, S. I. & Holmgren, A. (2008). *J. Biol. Chem.* 283, 21890–21898.
- Hattori, K., Naguro, I., Runchel, C., Ichijo, H. (2009). *Cell Commun. Signal.* 7, 9.
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. & Hardie, D. G. (2005). *Cell Metab.* 2, 9–19.
- Hayakawa, R., Hayakawa, T., Takeda, K. & Ichijo, H. (2012). *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 88, 434–453.
- Holmgren, A., Soderberg, B. O., Eklund, H. & Branden, C. I. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 2305–2309.
- Huminiecki, L. & Heldin, C. H. (2010). *BMC Biol.* 8, 146.
- Hunter, T. (1987). *Cell* 50, 823–829.
- Hunter, T. (2002). *Keio J. Med.* 51, 61–71.
- Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R. & Witters, L. A. (2005). *J. Biol. Chem.* 280, 29060–6.

- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. & Gotoh, Y. (1997). *Science* 275, 90–94.
- Ichimura, T., Taoka, M., Hozumi, Y., Goto, K. & Tokumitsu, H. (2008). *FEBS Lett.* 582, 661–665.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J. & Pavletich, N. P. (1995). *Nature* 376, 313–320.
- Johnson, C., Crowther, S., Stafford, M. J., Campbell, D. G., Toth, R. & MacKintosh, C. (2010). *Biochem. J.* 427, 69–78.
- Johnson, L. N., Noble, M. E. & Owen, D. J. (1996). *Cell* 85, 149–158.
- Kacirova, M., Kosek, D., Kadek, A., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V. & Obsil, T. (2015). *J. Biol. Chem.* 290, 16246–16260.
- Kallis, G. B. & Holmgren, A. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 10261–10265.
- Kasahara, M. (2013). *Cell Dev. Biol.*, 24, 81–82.
- Kawarazaki, Y., Ichijo, H. & Naguro, I. (2014). *Expert. Opin. Ther. Targets* 18, 651–664.
- Kim, C., Xuong, N. H. & Taylor, S. S. (2005). *Science* 307, 690–696.
- Kitani, T., Okuno, S. & Fujisawa, H. (2001). *J. Biochem. (Tokyo)*. 130, 515–525.
- Klein, D. C., Ganguly, S., Coon, S. L., Shi, Q., Gaildrat, P., Morin, F., Weller, J. L., Obsil, T., Hickman, A. & Dyda, F. (2003). *J. Neuroendocrinol.* 15, 370–377.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. & Svergun, D. I. (2003). *J. Appl. Crystallogr.* 36, 1277–1282.
- Kopecka, M., Kosek, D., Kukacka, Z., Rezabkova, L., Man, P., Novak, P., Obsil, T. & Obsilova, V. (2014). *J. Biol. Chem.* 289, 13948–13961.
- Kosek, D., Kylarova, S., Psenakova, K., Rezabkova, L., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V. & Obsil, T. (2014). *J. Biol. Chem.* 289, 24463–24474.
- Kozin, M. B. & Svergun, D. I. (2001). *J. Appl. Crystallogr.* 34, 33–41.
- Krumschnabel, G., Manzl, C. & Villunger, A. (2009). *Oncogene* 28, 3093–3096.
- Kukimoto-Niino, M., Yoshikawa, S., Takagi, T., Ohsawa, N., Tomabeche, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Suzuki, A., Lee, S., Yamauchi, T., Okada-Iwabuchi, M., Iwabuchi, M., Kadowaki, T., Minokoshi, Y. & Yokoyama, S. (2011). *J. Biol. Chem.* 286, 22570–22579.
- Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (1999). *Genes Dev.* 13, 1067–1072.
- Kumar, S. (2009). *Nat. Rev. Cancer* 9, 897–903.

- Kyriakis, J. M. (2001). *Nature* 414, 265–266.
- Lakowicz, J.R. (2006a). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Boston, MA: Springer US.
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R. J., Fu, H. & Liddington, R. (1995). *Nature*. 376, 191–194.
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. & Kyriakis, J. M. (2000). *Mol. Cell. Biol.* 20, 2198–2208.
- Liu, Q., Wilkins, B. J., Lee, Y. J., Ichijo, H. & Molkentin, J. D. (2006). *Mol. Cell. Biol.* 26, 3785–3797.
- Liu, Y. & Min, W. (2002). *Circ. Res.* 90, 1259–1266.
- Manning, G. (2002). *Science* 298, 1912–1934.
- Manning, G. (2002) *Trends Biochem. Sci.* 27, 514–520.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002). *Science* 298, 1912–1934.
- Masters, S. C., Pederson, K. J., Zhang, L., Barbieri, J. T. & Fu, H. (1999). *Biochemistry (Mosc.)*. 38, 5216–5221.
- Matsushita, M. & Nairn, A. C. (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 10086–10093.
- McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J. & Lefkowitz, R. J. (2000). *Science* 290, 1574–1577.
- Miles, M.A., Kitevska-Ilioski T. C. & Hawkins, J. (2017). *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 332, 155–212.
- Moore, B. W. & McGregor, D. (1965). *J. Biol. Chem.* 240, 1647–1653.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. & Shaw, A. S. (1996). *Cell* 84, 889–897.
- Nadeau, P. J., Charette, S. J. & Landry, J. (2009). *Mol. Biol. Cell.* 20, 3628–3637.
- Nakanishi, A., Hatano, N., Fujiwara, Y., Sha’ri, A., Takabatake, S., Akano, H., Kanayama, N., Magari, M., Nozaki, N. & Tokumitsu, H. (2017). *J. Biol. Chem.* 292, 19804–19813.
- Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. (2007). *Nat. Protoc.* 2, 2212–2221.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. & Ichijo, H. (2002). *Genes Dev.* 16, 1345–1355.
- Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J.-I. & Ichijo, H. (2005). *J. Biol. Chem.* 280, 37033–37040.

- Nolen, B., Taylor, S. & Ghosh, G. (2004). *Mol. Cell* 15, 661–675.
- Nutt, L. K., Margolis, S. S., Jensen, M., Herman, C. E., Dunphy, W. G., Rathmell, J. C. & Kornbluth, S. (2005). *Cell* 123, 89–103.
- Nutt, L. K., Buchakjian, M. R., Gan, E., Darbandi, R., Yoon, S. Y., Wu, J. Q., Miyamoto, Y. J., Gibbons, J. A., Andersen, J. L., Freel, C. D., Tang, W., He, C., Kurokawa, M., Wang, Y., Margolis, S. S., Fissore, R. A. & Kornbluth S. (2009). *Dev. Cell* 16, 856–866.
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S. & Dyda, F. (2001). *Cell* 105, 257–267.
- Okuno, S., Kitani, T. & Fujisawa, H. (2001). *J. Biochem. (Tokyo)*. 130, 503–513.
- Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J.-L. & Oecking, C. (2007). *Mol. Cell*. 25, 427–440.
- Qin, J., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1994). *Structure* 2, 503–522.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. (2001). *Endocr. Rev.* 22, 153–183.
- Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V. & Svergun, D. I. (2012a). *J. Appl. Crystallogr.* 45, 342–350.
- Philo, J. S. (2006). *Anal. Biochem.* 354, 238–246.
- Pop, C. & Salvesen, G.S. (2009). *J. Biol. Chem.* 284, 21777–21781.
- Racioppi, L. & Means, A. R. (2012). *J. Biol. Chem.* 287, 31658–31665.
- Rambo, R. P. (2015). *Methods Enzymol.* 558, 363–390.
- Rathmell, J. C., & Thompson, C. B. (1999) *Annu. Rev. Immunol.* 17, 781–828.
- Raveh, B., Enosh, A., Schueler-Furman, O. & Halperin, D. (2009). *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000295.
- Receveur-Brechot, V. & Durand, D. (2012). *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 55–75.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J. & Yaffe, M. B. (1999). *Mol. Cell.* 4, 153–166.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. & Ichijo, H. (1998). *EMBO J.* 17, 2596–2606.
- Schweizer, A., Briand, & C. Grutter, M.G. (2003). *J. Biol. Chem.* 278, 42441–42447.
- Schuck, P. (2000). *Biophys. J.* 78, 1606–1619.

- Schuck, P. (2003). *Anal. Biochem.* 320, 104–124.
- Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Tainer, J. A. & Sali, A. (2013). *Biophys. J.* 105, 962–974.
- Seong, H. A., Jung, H., Ichijo, H., Ha, H. (2010). *J. Biol. Chem.* 285, 2397–2414.
- Shiizaki, S., Naguro, I. & Ichijo, H. (2013). *Adv. Biol. Regul.* 53, 135–144.
- Silhan, J., Vacha, P., Strnadova, P., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V. & Obsil, T. (2009). *J. Biol. Chem.* 284, 19349–19360.
- Sluchanko, N. N., Beelen, S., Kulikova, A.A., Weeks, S. D., Antson, A. A., Gusev, N. B. & Strelkov, S. V. (2017). *Structure* 25, 305–316.
- Soderling, T. R. (1999). *Trends Biochem. Sci.* 24, 232–236.
- Steller, H. (1995). *Science* 267, 1445–1449.
- Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). *Annu. Rev. Biochem.* 69, 217–245.
- Studier, F. W. (2005). *Protein Expr. Pur.* 41, 207–234.
- Svergun, D. I. (1992). *J. Appl. Crystallogr.* 25, 495–503.
- Svergun, D., Barberato, C. & Koch, M. H. J. (1995). *J. Appl. Crystallogr.* 28, 768–773.
- Svergun, D. I. (1999). *Biophys. J.* 76, 2879–2886.
- Swulius, M. T. & Waxham, M. N. (2008). *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2637–2657.
- Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Kishida, S., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. & Ichijo, H. (2004). *EMBO Rep.* 5, 161–166.
- Takeda, K., Shimozone, R., Noguchi, T., Umeda, T., Morimoto, Y., Naguro, I., Tobiume, K., Saitoh, M., Matsuzawa, A. & Ichijo, H. (2007). *J. Biol. Chem.* 282, 7522–7531.
- Tan, S. (2001). *Protein Expr. Purif.* 21, 224–234.
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y. A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C. & Shimamoto, K. (2011). *Nature* 476, 332–335.
- Tinel, A. & Tschopp, J. (2004). *Science* 304, 843–846.
- Tinti, M., Johnson, C., Toth, R., Ferrier, D. E. & Mackintosh, C. (2012). *Open Biol.* 2, 120103.
- Tinti, M., Madeira, F., Murugesan, G., Hoxhaj, G., Toth, R. & MacKintosh, C. (2014).

Database (Oxford) bat085.

Tobiume, K., Saitoh, M. & Ichijo, H. (2002). *J. Cell. Physiol.* 191, 95–104.

Tokumitsu, H., Iwabu, M., Ishikawa, Y. & Kobayashi, R. (2001). *Biochemistry (Mosc.)*. 40, 13925–13932.

Tokumitsu, H., Muramatsu, M., Ikura, M. & Kobayashi, R. (2000). *J. Biol. Chem.* 275, 20090–20095.

Tokumitsu, H., Takahashi, N., Eto, K., Yano, S., Soderling, T. R. & Muramatsu, M. (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 15803–15810.

Tria, G., Mertens, H. D. T., Kachala, M. & Svergun, D. I. (2015). *IUCrJ*. 2, 207–217.

Troy, C. M., & Shelanski, M. L. (2003). *Cell Death Differ.* 10, 101–107.

Vecer, J. & Herman, P. (2011). *J. Fluoresc.* 21, 873–881.

Volkov, V. V. & Svergun, D. I. (2003). *J. Appl. Crystallogr.* 36, 860–864.

Watson, W. H., Pohl, J., Montfort, W. R., Stuchlik, O., Reed, M. S., Powis, G. & Jones, D. P. (2003). *J. Biol. Chem.* 278, 33408–33415.

Wayman, G. A., Lee, Y. S., Tokumitsu, H., Silva, A. J. & Soderling, T. R. (2008). *Neuron* 59, 914–931.

Wayman, G. A., Tokumitsu, H. & Soderling, T. R. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 16073–16076.

Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G. & Montfort, W. R. (1996). *Structure* 4, 735–751.

Weijman, J. F., Kumar, A., Jamieson, S. A., King, C. M., Caradoc-Davies, T. T., Ledgerwood, E. C., Murphy, J. M. & Mace, P. D. (2017). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E2096–E2105.

White, A., Pargellis, C. A., Studts, J. M., Werneburg, B. G. & Farmer, B. T. (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 6353–6358.

Weinkam, P., Pons, J. & Sali, A. (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 4875–4880.

Xiao, B., Smerdon, S. J., Jones, D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A. & Gamblin, S. J. (1995). *Nature* 376, 188–191.

Yaffe, M. B. (2002). *FEBS Lett.* 513, 53–57.

Yaffe, M. B. & Elia, A. E. (2001). *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 131–138.

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. & Cantley, L. C. (1997). *Cell*. 91, 961–971.

Zhang, L., Chen, J. & Fu, H. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8511–8515.

Zhang, R. (2004). *Circ. Res.* 94, 1483–1491.

Přílohy